

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



## **Biomarcadores Genéticos E Circulantes Compartilhados Pela Psoríase E Doença Cardiovascular**

Ângela Cristina Dias Gil

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Manuel Bicho (orientador externo)

Professora Doutora Deodália Dias (orientadora interna)



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Biomarcadores Genéticos E Circulantes Compartilhados Pela  
Psoríase E Doença Cardiovascular**

Ângela Cristina Dias Gil

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Manuel Bicho (orientador externo)

Professora Doutora Deodália Dias (orientadora interna)

## NOTAS PRÉVIAS

Esta tese de mestrado foi escrita de acordo com o formato de citação da revista *International Journal of Dermatology*

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*  
(Cora Coralina)



*Aquém sempre acreditou*





## **AGRADECIMENTOS**

Expresso aqui o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste estudo. Em particular:

Ao Professor Doutor Manuel Bicho por me motivar por este projeto, pelo seu conhecimento, disponibilidade para ensinar e confiança, que se revelaram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Deodália Dias, por toda a simpatia demonstrada, pelo carinho, disponibilidade e consideração que tem pelos seus alunos.

Ao serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa do Professor Doutor Paulo Filipe, pelo fornecimento das amostras biológicas, e de modo particular a Doutora Ana Teixeira, pelo apoio clínico, disponibilidade e simpatia.

Ao Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral pelo financiamento parcial do projeto e pela cedência das instalações e equipamento necessários para desenvolver uma parte deste trabalho.

A equipa do Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, nomeadamente a Dr. Alda Pereira da Silva e Dr. Isanete Alonso pela amizade, apoio e incentivo. E um obrigado especial a mestre Andreia Matos, pela amizade, companheirismos, apoio, colaboração, por acreditar em mim e nas minhas capacidades, e por cada palavra.

Um obrigada especial aos meus amigos por cuidarem de mim em todos os momentos e acreditarem sempre que iria ser capaz.

Por ultimo, mas não menos importante, um obrigada especial a minha família, pelo amor, carinho e paciência e compreensão, sem o vosso apoio e incentivo nada disto seria possível. Obrigada por tornarem o caminho mais fácil!



## RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, imunomediada, que tem sido associada a um risco aumentado de doença cardiovascular, devido ao aumento da incidência de fatores de risco cardiovasculares, como a hipertensão, diabetes mellitus e dislipidemia, e por outro, pelo estado inflamatório sistêmico existente em particular nos doentes mais graves, responsável pelo desenvolvimento de aterosclerose precoce.

O objetivo é estudar a existência de biomarcadores genéticos e/ou bioquímicos associados ao processo inflamatório, compartilhados pela psoríase e doença cardiovascular, fundamentalmente a via da homocisteína e do stresse oxidante. Os genes estudados *ECA*, *NOS3*, *MPO*, *DHFR*, *MTHFR* e *COMT*, assim como as atividades enzimáticas do eritrócito, redutase transmembranar (RTM), redutase da metahemoglobina (RTMHb) e fosfatase ácida (FA), e a atividade sérica da enzima conversor de angiotensina (ECA), foram selecionados tendo em vista o stresse oxidante e a via da homocisteína.

A amostra foi constituída por 421 indivíduos (N=63 psoríase; N=358 controlos, dos quais 82 com hipertensão). A gravidade da doença foi determinada pelo PASI, e as análises correntes por métodos padrão. Os polimorfismos genéticos foram determinados por PCR e PCR-RFLP. A RTM, RTMHb e FA, e a atividade sérica da ECA foram determinados por espectrofotometria. A análise estatística foi realizada no programa SPSS21.0. Valores estatisticamente significativos para  $p < 0.05$ .

Os resultados encontrados demonstram uma relação genótipo-fenótipo em que o stresse oxidante e uma possível desregulação na via da homocisteína contribuem para o desenvolvimento e progressão da patologia, nomeadamente as atividades enzimáticas do eritrócito que se encontram diminuídas nos doentes.

Os polimorfismos analisados não demonstram uma relação com a gravidade da psoríase, nem para os HTA, sendo uma doença multifatorial, fatores ambientais e imunológicos serão necessários ao desenvolvimento e progressão. No entanto alterações nas atividades enzimáticas do eritrócito, assim como a atividade sérica da ECA sugerem um stresse oxidante nos psoríase, característica das doenças cardiovasculares.

**Palavras chaves:** Psoríase Doença cardiovascular, stresse oxidante eritrócito

## **ABSTRACT**

Psoriasis is a chronic inflammatory disease, immune-mediated, which has been associated with an increased risk of cardiovascular disease due to the increased incidence of cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia, and on the other hand, the systemic inflammatory condition existing particularly in the most seriously ill patients, responsible for the early development of atherosclerosis.

The purpose is to study the existence of genetic and/or biochemical biomarker associated with the inflammation process are shared by psoriasis and cardiovascular disease, mainly the path of homocysteine and oxidative stress. The genes studied ACE, NOS3, MPO, DHFR, MTHFR and COMT as well as the enzymatic activities of erythrocyte reductase transmembrane (TMR) methemoglobin reductase (TMRHb) and acid phosphatase (AP), and serum enzyme activities converter ACE (ACE), were selected to understand the oxidative stress and the way of homocysteine.

The sample consisted of 421 subjects (N=63 psoriatic; N=358 controls, of which 82 with hypertension). The severity of disease was determined by PASI current analysis is by standard methods. Genetic polymorphisms were determined by PCR and PCR-RFLP. The TMR TMRHb and FA, and serum ACE activity was determined by spectrophotometry. Statistical analysis was performed using SPSS21.0 program. statistically significant values for  $p < 0.05$ .

The results show genotype-phenotype relationship in which oxidative stress and possible disruption towards homocysteine contribute to the development and progression of pathology, the enzymatic activities of the erythrocyte which are reduced in patients.

The polymorphisms analyzed did not demonstrate a relationship with the severity of psoriasis, or for the HTA, is a multifactorial disease, immunological and environmental factors are required for the development and progression. However, changes in enzyme activity of erythrocyte, and serum ACE activity suggest oxidative stress in psoriasis, characteristic of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Psoriasis Cardiovascular disease, oxidative stress erythrocyte

## **PUBLICAÇÕES**

Gil Â., Matos A., Pereira da Silva A., Teixeira A.I., Bicho M.,Filipe P. “*BLOOD OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND GENETIC SUSCEPTIBILITY IN CARDIOVASCULAR RISK ASSOCIATED TO PSORIASIS*”, Internal Medicine Parallel Oral Session of the Eleventh YES - Young European Scientist – Meeting, Porto, Portugal, September 16th-18th, 2016 (Oral)

Teixeira AI, Matos A, Gil A, Pereira da Silva A, Bicho M, Filipe P. “*Susceptibility to psoriasis associated to cardiovascular risk genotypes*”, American Academy of Dermatology, Washington, D.C, 4 - 8 March, 2016 (Poster).



## ÍNDICE

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Introdução</b>  | <b>3</b> |
| 1.1. A Psoríase   | 3        |
| 1.1.1. Classificação Da Psoríase  | 4        |
| 1.1.1.1. Classificação Da Psoríase Em Função Da Idade De Aparecimento     | 4        |
| 1.1.1.2. Classificação Da Psoríase Em Função Da Morfologia                | 4        |
| 1.1.1.2.1. Psoríase em Placas   | 4        |
| 1.1.1.2.2. Psoríase Inversa   | 5        |
| 1.1.1.2.3. Psoríase Gutata  | 5        |
| 1.1.1.2.4. Psoríase Pustular  | 5        |
| 1.1.1.2.5. Psoríase Eritrodérmica   | 6        |
| 1.1.1.3. Classificação Da Gravidade Da Psoríase                           | 6        |
| 1.1.2. Patofisiologia   | 7        |
| 1.1.2.1. Fatores Imunitários  | 7        |
| 1.1.2.2. Fatores Genéticos.   | 9        |
| 1.1.2.3. Fatores Ambientais   | 9        |
| 1.1.3. Artrite Psoriática   | 10       |
| 1.2. Comorbilidades Cardiometabólicas E Doença Cardiovascular Na Psoríase | 10       |
| 1.2.1. Hipertensão Arterial   | 12       |
| 1.2.2. Resistência A Insulina/Diabetes Mellitus                           | 12       |
| 1.2.3. Dislipidemia   | 13       |
| 1.2.4. Obesidade  | 13       |
| 1.2.5. Síndrome Metabólico  | 14       |
| 1.2.6. Tabagismo  | 15       |
| 1.2.7. Doenças Cardiovascular   | 15       |
| 1.3. Sobrecarga Oxidante  | 16       |
| 1.4. Metabolismo Da Homocisteína  | 18       |
| 1.5. Biomarcadores  | 20       |
| 1.5.1. Polimorfismos Genéticos  | 20       |
| 1.5.1.1. Sintase Do Óxido Nítrico Endotelial                              | 20       |
| 1.5.1.2. Enzima Conversora De Angiotensina                                | 20       |
| 1.5.1.3. Redutase Da Dihidrofolato  | 21       |
| 1.5.1.4. Redutase Da Metilenotetrahidrofolato                             | 21       |
| 1.5.1.5. Mieloperoxidase  | 22       |
| 1.5.2. Parâmetros Bioquímicos   | 23       |

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 1.5.2.1.      | Redutase Transmembranar Do Eritrócito         | 23        |
| 1.5.2.1.      | Atividade Enzima Conversora De Angiotensina   | 23        |
| <b>2.</b>     | <b>Objetivo</b>                               | <b>27</b> |
| <b>3.</b>     | <b>Materiais e Métodos</b>                    | <b>31</b> |
| 3.1.          | População em estudo                           | 31        |
| 3.2.          | Colheita e Processamento de Sangue Periférico | 31        |
| 3.3.          | Redutase Transmembranar do eritrócito         | 31        |
| 3.4.          | Redutase da Metahemoglobina do eritrócito     | 32        |
| 3.5.          | Fosfatase Ácida do eritrócito                 | 32        |
| 3.6.          | Atividade da Enzima Conversor de Angiotensina | 32        |
| 3.7.          | Extração de DNA genómico                      | 32        |
| 3.8.          | Quantificação e determinação da pureza do DNA | 32        |
| 3.9.          | Variantes Genéticas Estudadas                 | 32        |
| 3.9.1.        | Determinação genética                         | 33        |
| 3.10.         | Análise Estatística                           | 34        |
| <b>4.</b>     | <b>Resultados</b>                             | <b>37</b> |
| 4.1.          | Caracterização da Psoriásica                  | 37        |
| 4.2.          | Fenótipos Intermédio na Psoríase              | 38        |
| 4.2.1.        | Caracterização das populações caso-controlo   | 42        |
| 4.3.          | Genes modificadores na Psoríase               | 42        |
| 4.4.          | Relação genótipo-fenótipo                     | 44        |
| 4.4.1.        | Psoríase                                      | 44        |
| 4.4.2.        | Caso-Controlo                                 | 46        |
| <b>5.</b>     | <b>Discussão</b>                              | <b>49</b> |
| <b>6.</b>     | <b>Conclusão</b>                              | <b>57</b> |
| <b>7.</b>     | <b>Referencias</b>                            | <b>61</b> |
| <b>Anexos</b> |   | <b>73</b> |
| Anexo 1:      | Calculo PASI                                  | 73        |
| Anexo 2:      | Consentimento informado                       | 74        |
| Anexo 3:      | Visualização do genótipo após eletroforese    | 75        |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1.1.</b> ESQUEMA DA EVOLUÇÃO DA LESÃO PSORIÁSICA, ADAPTADO DE SOUSA 2015 <sup>23</sup>   | 8  |
| <b>FIGURA 1.2.</b> RELAÇÃO ENTRE PSORÍASE, INFLAMAÇÃO, COMORBILIDADES CARDIOVASCULARES E DOENÇA CARDIOVASCULAR. ADAPTADO DE TORRES ET AL 2013 <sup>7</sup> | 11 |
| <b>FIGURA 1.3.</b> ESQUEMA DA VIA DO METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA.  | 18 |
| <b>FIGURA 4.1.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ECA COM PASI (A) E VARIAÇÃO DA FA COM A RTMHb EM PACIENTES COM PSORÍASE               | 39 |
| <b>FIGURA 4.2.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA VARIAÇÃO DA RTMHb COM O COLESTEROL TOTAL.  | 40 |
| <b>FIGURA 4.3.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO DA MTHFR, SEGUNDO O MODELO TT+CT VS CC EM RELAÇÃO A RTM                               | 44 |
| <b>FIGURA 4.4.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO DA COMT, ECA E MPO EM RELAÇÃO A ATIVIDADE DA FA.                                      | 45 |
| <b>FIGURA 4.5.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA DISTRIBUIÇÃO DO GENÓTIPO DA ECA EM RELAÇÃO A ATIVIDADE DA ECA.   | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 3.1.</b> POLIMORFISMOS GENÉTICOS ANALISADOS, LOCALIZAÇÃO NO CROMOSSOMA E RESPETIVAS ALTERAÇÕES _____  | 33 |
| <b>TABELA 3.2.</b> RESUMO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADAS PARA DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DOS POLIMORFISMOS. _____                               | 33 |
| <b>TABELA 3.3.</b> RESUMO DAS CONDIÇÕES UTILIZADAS NA ELETROFORESE PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DAS VARIANTES GENÉTICAS ANALISADAS _____             | 34 |
| <b>TABELA 4.1.</b> CARACTERÍSTICAS GERAIS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO PSORIÁSICA _____  | 37 |
| <b>TABELA 4.2.</b> CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO PSORIÁSICA SEGUNDO O ÍNDICE DE GRAVIDADE (PASI). _____  | 38 |
| <b>TABELA 4.3.</b> CORELAÇÃO DA VARIEDADE DO ÍNDICE DE GRAVIDADE (PASI) COM PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO. _____  | 39 |
| <b>TABELA 4.4.</b> CORELAÇÃO DA ATIVIDADE DA RTM COM PARÂMETROS LABORATORIAIS DO HEMOGRAMA E PERFIL LIPÍDICO. _____                                     | 40 |
| <b>TABELA 4.5.</b> CORELAÇÃO DA ATIVIDADE DA FA COM PARÂMETROS LABORATORIAIS DO HEMOGRAMA E SÉRICOS. _____  | 41 |
| <b>TABELA 4.6.</b> CORELAÇÃO DO SÓDIO COM PARÂMETROS LABORATORIAIS DO HEMOGRAMA E SÉRICOS. _____  | 41 |
| <b>TABELA 4.7.</b> CORELAÇÃO DA BILIRRUBINA TOTAL E DIRETA COM PARÂMETROS LABORATORIAIS DO HEMOGRAMA. _____   | 41 |
| <b>TABELA 4.8.</b> CARATERÍSTICAS SELECIONADAS DA AMOSTRA ESTUDADA _____  | 42 |
| <b>TABELA 4.9.</b> DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA ECA, E <sub>NO</sub> S, MPO, DHFR, MTHFR, COMT, EM CONTROLOS, DOENTES PSORIÁSICOS E HTA-SUBGRUPO _____ | 43 |
| <b>TABELA 4.10.</b> DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA MPO E ECA EM INDIVÍDUOS COM PSORÍASE, DE ACORDO COM A IDADE DE DIAGNOSTICO: _____                     | 44 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| APC           | Células apresentadoras de antígeno               |
| AVC           | Acidente vascular cerebral                       |
| CD            | Células dendríticas-                             |
| CDm           | Células dendríticas mielóides ()                 |
| CDp           | Células dendríticas plasmocitóides               |
| COMT          | Catecol-O-Metiltransferase                       |
| DHFR          | Dihidrofolato redutase                           |
| DM            | Diabetes mellitus                                |
| DNA           | Ácido desoxirribonucleico                        |
| EAM           | Enfarte agudo do miocárdio                       |
| ECA           | Enzima conversor da angiotensina                 |
| eNOS/NOS3     | Endotelial NOS                                   |
| FA            | Fosfatase Ácida                                  |
| FAPGG         | N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly              |
| HDL           | <i>High-density lipoprotein</i>                  |
| HGM           | Hemoglobina globular média                       |
| HLA           | Antígenos leucocitários humanos                  |
| HTA           | Hipertensão arterial                             |
| HW            | Hardy-Weinberg                                   |
| IL            | Interleucina                                     |
| IMC           | Índice de massa corporal                         |
| INF- $\alpha$ | Interferão- $\alpha$                             |
| iNOS/NOS2     | Indutível de NOS                                 |
| Kb            | Kilobase   |
| LDL           | <i>Low-density lipoprotein</i>                   |
| MHC-          | Complexo de Histocompatibilidade Major           |
| MHCII         | Complexo de Histocompatibilidade Major classe II |

|               |   |
|---------------|---|
| MPO           | Mieloperoxidase                                 |
| MTHFR         | redutase do metilenotetrahidrofolato            |
| NADPH         | Dinucleotídio reduzido da nicotinamida adenina  |
| nNOS/NOS1     | Neuronal NOS                                    |
| NO            | Óxido nítrico                                   |
| NOSS          | Sintase do óxido nítrico                        |
| PASI          | Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase      |
| pb            | Ppares de base                                  |
| PCR           | Reação de polimerização em cadeia               |
| RFLP          | <i>Restriction fragment lenght polymorphism</i> |
| RMHb          | Redutase da Metahemoglobina                     |
| ROS           | Espécies reativas de oxigénio                   |
| RTM           | Redutase transmembranar                         |
| SNP           | <i>Single nucleotide polymorphism</i>           |
| SP1           | <i>Specificity protein 1</i>                    |
| Th            | T helper  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral $\alpha$               |
| Treg          | Linfócitos T reguladores                        |
| VGM           | Volume globular médio                           |
| VLDL          | <i>Very low-density lipoprotein</i>             |

# INTRODUÇÃO



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A PSORÍASE

A psoríase é uma doença de natureza inflamatória e autoimune que se manifesta na epiderme, não oferecendo risco de contágio, pois trata-se de uma doença não infecciosa. Apresenta maior prevalência nas populações caucasianas (1.5-3%) do que nas populações negras (0.3-0.7%), o que sugere uma influência étnica e geográfica na sua prevalência.<sup>1-4</sup>

É uma patologia que afeta igualmente homens e mulheres, sendo que as mulheres desenvolvem a doença mais cedo. Pode surgir em qualquer idade, porem apresenta dois picos de incidência; o primeiro entre os 20 e 30 anos, o segundo entre os 50 e os 60 anos de idade, sendo que o aparecimento precoce parece estar relacionado com uma psoríase hereditária, e consequentemente mais severa.<sup>2,3,5</sup>

Trata-se de uma dermatose tipicamente eritemato-descamativa, com expressão clínico patológica característica e de evolução crônica, com períodos de exacerbação imprevisíveis, de intensidade variável, intercalados por épocas de remissão que podem ocorrer de forma espontânea ou induzida pelo tratamento. Assim sendo com o aparecimento inicial da doença não é possível prever a sua evolução, pois pode tratar-se de uma manifestação aguda de duração limitada ou então alternar com períodos de exacerbação e remissão.<sup>3,6,7</sup>

Os doentes tendem a apresentar certas zonas da pele recobertas por lesões psoriásicas características, estas lesões apresentam uma área bem delineada de placas eritematosas espessas, avermelhadas e cobertas de escamas descamativas de cor prateada. As zonas do corpo mais afetadas são os cotovelos, joelhos, couro cabeludo, região lombar e sagrada, glande do pénis e região interglútea.<sup>6,8</sup>

A etiologia da doença não está bem definida, mas reconhece-se o papel da hereditariedade e do envolvimento de fatores genéticos na suscetibilidade de a desenvolver, fatores ambientais, bem como uma desregulação do sistema imunológico.<sup>3,9</sup>

A interação entre estes fatores genéticos e ambientais determina a patogénese da psoríase, onde se verifica um encurtamento do ciclo germinativo epidérmico, com aumento da atividade mitótica dos queratinócitos basais, e consequente descamação continuada da pele lesada. Todavia, esta proliferação epidérmica não é responsável por si só pela patogénese da psoríase, pois a mediação por fatores inflamatórios locais e sistémicos é fundamental, nomeadamente a ativação de células T cutâneas e de queratinócitos epidérmicos, que estimulam a produção de mediadores inflamatórios como citocinas.<sup>6,7</sup>

A psoríase está associada a grande morbilidade e diminuição da qualidade de vida. Apesar da mortalidade diretamente atribuível à doença ser baixa, esta interfere direta e indiretamente nas atividades do dia a dia, nas relações sociais e interpessoais, conduzindo a atos de rejeição social, promovendo quadros emocionais instáveis, com disfunção emocional, depressão e suicídio.<sup>10</sup>

Admitindo que recentemente, certas comorbilidades como as doenças cardiovasculares, obesidade e síndrome metabólica têm sido associadas à psoríase, esta última deixa de ser considerada clinicamente como uma doença dermatológica, assumindo-se como uma doença a nível sistémico<sup>9</sup>. As condições que no seu conjunto constituem a síndrome metabólica (obesidade, dislipidémia, hipertensão arterial e diabetes mellitus) encontram-se fortemente associadas à psoríase, quer pela maior prevalência de fatores

## **INTRODUÇÃO**

de risco cardiovasculares nestes doentes, quer pela atividade inflamatória crónica que se verifica na psoríase e que está na origem do desenvolvimento da síndrome metabólica.<sup>11,12</sup>

### **1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DA PSORÍASE**

Atualmente são conhecidos diversos tipos de psoríase com diferentes características e com níveis variados de gravidade. Porém a morfologia básica da lesão psoriásica, associada ao prurido e descamação é comum a todos os tipos. Deste modo podemos classificar a psoríase quanto à idade de aparecimento, à morfologia das lesões e à severidade da doença.

#### **1.1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DA PSORÍASE EM FUNÇÃO DA IDADE DE APARECIMENTO**

A idade de aparecimento da forma vulgar da psoríase, mais precoce ou mais tardia, pode estar relacionada com fatores hereditários, classificada em dois tipos: o tipo 1, de aparecimento antes dos 40 anos de idade, com uma incidência familiar aumentada e maior tendência para se tornar doença generalizada e o tipo 2, de aparecimento por volta dos 60 anos de idade, sem predisposição familiar e de ocorrência esporádica.<sup>6</sup>

#### **1.1.1.2. CLASSIFICAÇÃO DA PSORÍASE EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA**

A classificação fenotípica em função da morfologia das lesões é a mais utilizada, uma vez que o diagnóstico é feito quase sempre baseado na clínica.

A psoríase apresenta diversas manifestações cutâneas, e também articulares, contudo, a morfologia básica da lesão psoriásica, associada ao prurido e descamação é comum a todos os tipos. Todavia não pode ser feita uma classificação definitiva para um doente, uma vez que podem coexistir num só indivíduo concomitantemente diferentes formas da doença ou até ocorrer uma evolução de uma variante para outra mais grave.<sup>7,10,13,14</sup>

Segundo a classificação da Associação Portuguesa da Psoríase (PSOPortugal), existem diversos tipos de Psoríase, destacando os mais importantes: em placas, inversa, gutata, pustular e eritrodérmica.<sup>15</sup>

##### **1.1.1.2.1. PSORÍASE EM PLACAS**

A psoríase em placa, ou psoríase vulgar (Psoriasis vulgaris) caracteriza-se por placas eritematosas e escamas que se desenvolvem de uma forma simétrica. Nesta variante, qualquer parte da pele pode ser afetada. É a variante morfológica mais comum da psoríase e afeta 80% a 90% dos doentes psoriásicos.<sup>10</sup>

As lesões apresentam formas irregulares, com distribuição tendencialmente simétrica e localizam-se predominantemente nos cotovelos e joelhos, couro cabeludo, região sacral, região umbilical, prega interglútea e zona genital. Estas lesões quando surgem são, em geral, pequenas e na ausência de



tratamento imediato tendem a aumentar e confluem de modo a originar manchas irregulares de grandes dimensões e contornos irregulares, que podem cobrir quase a totalidade da superfície corporal.<sup>7,10,16</sup>

A psoríase ungueal, comumente conhecida por psoríase das unhas, é uma forma clínica desta variante. Ocorre nas unhas, onde estas sofrem um processo de hiperqueratose, levando à discromia (alteração da pigmentação), onicólise (destacamento da unha) e fragmentação.<sup>13,17</sup>

Outra variante da psoríase em placa é a capilar, a qual incide maioritariamente no couro cabeludo, ultrapassando a linha de implantação do cabelo e atingindo, também, a zona posterior dos pavilhões auriculares.<sup>18</sup>

### **1.1.1.2.2. PSORÍASE INVERSA**

A psoríase inversa é uma variante psoriásica de difícil diagnóstico e que normalmente não se desenvolve isoladamente, mas sim em conjunto com um quadro clínico de psoríase vulgar. Afeta 2-6% dos doentes e as lesões localizam-se nas áreas intertriginosas, as áreas normalmente poupadas pela forma vulgar.<sup>6</sup>

Esta variante morfológica afeta as pregas cutâneas incluindo axilas, virilhas, umbigo, submamárias e interglúteas. As lesões características são, muitas vezes, eritematosas, maceradas, exsudativas e raramente descamam devido aos níveis elevados de humidade nessas áreas do corpo. As lesões são agravadas pelo suor e pelo atrito e são facilmente vulneráveis a contaminações fúngicas. Estas características permitem diferenciar a psoríase inversa da vulgar.<sup>7,13</sup>

### **1.1.1.2.3. PSORÍASE GUTATA**

A psoríase gutata é a segunda variante mais frequente desta dermatose, começando normalmente na infância ou adolescência.<sup>10</sup>

Caracteriza-se por pápulas de pequeno diâmetro (cerca de 1 cm), de forma semelhante a gotas, de coloração rosada a salmão, cobertas por uma fina escama. Podem aparecer em qualquer parte do corpo, incluindo face e orelhas, distribuídas de forma dispersa, contudo é mais frequente no tronco e extremidades proximais.<sup>14,16</sup>

Pode desaparecer definitivamente após o primeiro episódio ou evoluir para uma psoríase vulgar.<sup>15</sup> Não obstante, pode ser a manifestação inicial da psoríase numa pessoa saudável ou uma exacerbação aguda da doença já conhecida, e normalmente é precedida por infeção faríngea estreptocócica em 2 ou 3 semanas.<sup>6</sup>

### **1.1.1.2.4. PSORÍASE PUSTULAR**

A psoríase pustular apresenta duas formas clínicas, que se distinguem pela extensão e intensidade do compromisso cutâneo, além da sua gravidade e comprometimento sistémico. Esta variante morfológica, pode ser considerada como uma das formas mais raras e pouco diagnosticadas a nível clínico, sendo mais frequente aparecer em indivíduos adultos.<sup>13</sup>

## INTRODUÇÃO

Esta variante divide-se em duas formas clínicas: psoríase pustular generalizada (ou Von Zumbusch) e psoríase pustular localizada (ou palmo-plantar). A sua diferenciação pode ser feita com base no grau de acometimento cutâneo e/ou sistémico e na severidade e gravidade das lesões.<sup>16</sup>

De uma forma geral, as lesões associadas a esta variante consistem em pústulas brancas com pus de cariz não infeccioso ou contagioso. Geralmente, a pele localizada em volta destas lesões apresenta-se vermelha. Outro ponto importante é o carácter cíclico que este tipo de lesões pode assumir, em termos do seu aspeto e processo de formação, começando desta forma, com a vermelhidão no local da lesão progredindo, posteriormente, para pústulas escamosas.<sup>13,19</sup>

Ao contrario das restantes formas de psoríase, é acompanhada de sintomas gerais (febre, mau estar, etc.) e tem um risco elevado de desenvolvimento de complicações, algumas das quais potencialmente fatais.<sup>15</sup>

### 1.1.1.2.5. PSORÍASE ERITRODÉRMICA

Denomina-se psoríase eritrodérmica quando as lesões envolvem mais de 90% da superfície corporal, é geralmente acompanhada por prurido intenso, edema e dor, sendo a febre um sinal frequentemente presente.<sup>6</sup>

Em termos de incidência é a menos comum das variantes, mas também se caracteriza por apresentar uma elevada gravidade. Contudo, pode desenvolver-se gradual ou abruptamente a partir de qualquer tipo de psoríase, particularmente após cessação abrupta da terapêutica sistémica e toxicidade relacionada com a fototerapia ou infeção.<sup>14</sup>

A psoríase eritrodérmica tende a afetar a maior parte da superfície corporal e aparece mais frequentemente em indivíduos com casos instáveis de psoríase em placa.<sup>13</sup> O tipo de lesão característica desta variante têm uma natureza intensamente inflamatória e uma forma muito pouco definida, a qual se encontra disseminada por todo o corpo, exibindo uma cor vermelho vivo e de aspeto extremamente descamativo. Esta descamação implica a queda de porções maiores de pele, ao invés das pequenas escamas como na psoríase em placa. Geralmente são referidos sintomas como prurido e dor intensa, termorregulação corporal fraca, alterações cardiocirculatórias e desregulação do equilíbrio eletrolítico.<sup>6,13</sup> Assim sendo, esta forma de psoríase pode ser fatal, uma vez que a exuberância do eritema pode impedir a regulação térmica apropriada e diminuir a capacidade cutânea de barreira.

### 1.1.1.3. CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA PSORÍASE

A escolha da terapêutica depende da gravidade da psoríase, daí a necessidade de aplicar “índices de gravidade” que possibilitem avaliar a extensão e severidade clínica da doença. Todavia, a definição de psoríase em função da gravidade da doença não está estabelecida uniformemente, existindo vários tipos de classificação.<sup>8</sup>

O PASI- Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase- é o mais utilizado para avaliar a gravidade da patologia em ensaios clínicos. O PASI caracteriza-se por quantificar a intensidade de sinais e sintomas objetivos nomeadamente o prurido, o eritema, a espessura e a descamação, avaliados em graus de 0 a 4 em cada uma das secções, ver anexo 1. Esta avaliação considera 4 secções: a cabeça; os membros superiores; o tronco e o abdómen até as virilhas e, por último, os membros inferiores incluindo as

nádegas. A combinação da avaliação, de cada secção, dá origem a um resultado final em que, os valores mais baixos correspondem a psoríase ligeira e os valores mais altos a formas mais graves.<sup>6,8,20</sup>

Devido à sua complexidade, esta avaliação não é muito utilizada na prática clínica sendo que, de uma forma geral, a psoríase é classificada como ligeira se as lesões atingirem menos de 2% da superfície corporal, moderada caso envolvam 2-10% e severa caso acometam mais de 10%.<sup>8</sup>

A gravidade da psoríase pode ainda ser classificada em função da necessidade de terapêutica ou de hospitalização. Desta forma, considera-se a psoríase ligeira se não necessitar de tratamento, moderada caso necessite apenas de terapêutica tópica e severa quando envolve necessidade de terapêutica sistémica e/ou hospitalização.<sup>6</sup>

### 1.1.2. PATOFISIOLOGIA

Como referido anteriormente a patogenia da psoríase é complexa e ainda não se encontra totalmente esclarecida. Certamente não existe um único fator capaz de desencadear a psoríase, mas sim uma sequencia de eventos que culmina na expressão clínica da doença.<sup>9,21</sup>

A psoríase é uma doença multifatorial assente numa nítida base de determinação genética com envolvimento ambiental simultâneo. Fatores genéticos, imunológicos e ambientais interagem entre si até culminar nas manifestações clínicas cutâneas e articulares características da psoríase.

#### 1.1.2.1. FATORES IMUNITÁRIOS

A ativação imunitária da psoríase é complexa e envolve alterações do sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas- CD, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais) e adquirido (linfócitos T).<sup>22</sup>

No início do processo imunológico, os queratinócitos da pele são estimulados por diversos fatores externos/ambientais, levando-os a produzir citocinas e outros fatores quimiotáticos. Esta sua propriedade pró-inflamatória permite chamar à pele, neutrófilos e linfócitos T.<sup>23</sup> Ainda, mais especificamente, a síntese de interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  durante esta fase, e permite ativar as células dendríticas da pele. As células dendríticas têm as funções de produzir mais moléculas inflamatórias e são células apresentadoras de antígeno (APC). Este ponto vai ser fulcral para formação das lesões psoriásicas.<sup>24</sup>

As células T são classicamente subdivididas em células T helper 1 (Th1) e células T helper 2 (Th2) tendo em conta o tipo de citocinas que produzem. De acordo com o perfil de citocinas secretadas, a psoríase era considerada uma patologia de mediação imunitária com envolvimento primordial das células Th1<sup>23</sup>. Atualmente, acredita-se que um novo subtipo, as células T helper 17 (Th17) podem estar também envolvidas no processo imunitário da psoríase, juntamente com as Th1.<sup>6,23</sup>

No despoletar da doença, os fatores desencadeantes vão iniciar uma série de eventos, responsáveis pela ativação das células dendríticas plasmocitóides (CDp). Estas por sua vez vão secretar o interferão- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) que acuta sobre as células dendríticas mielóides (CDm) incitando a sua migração até aos gânglios linfáticos. Nos gânglios linfáticos secretam interleucina (IL)-12 e IL-23 que ativam a expansão

## INTRODUÇÃO

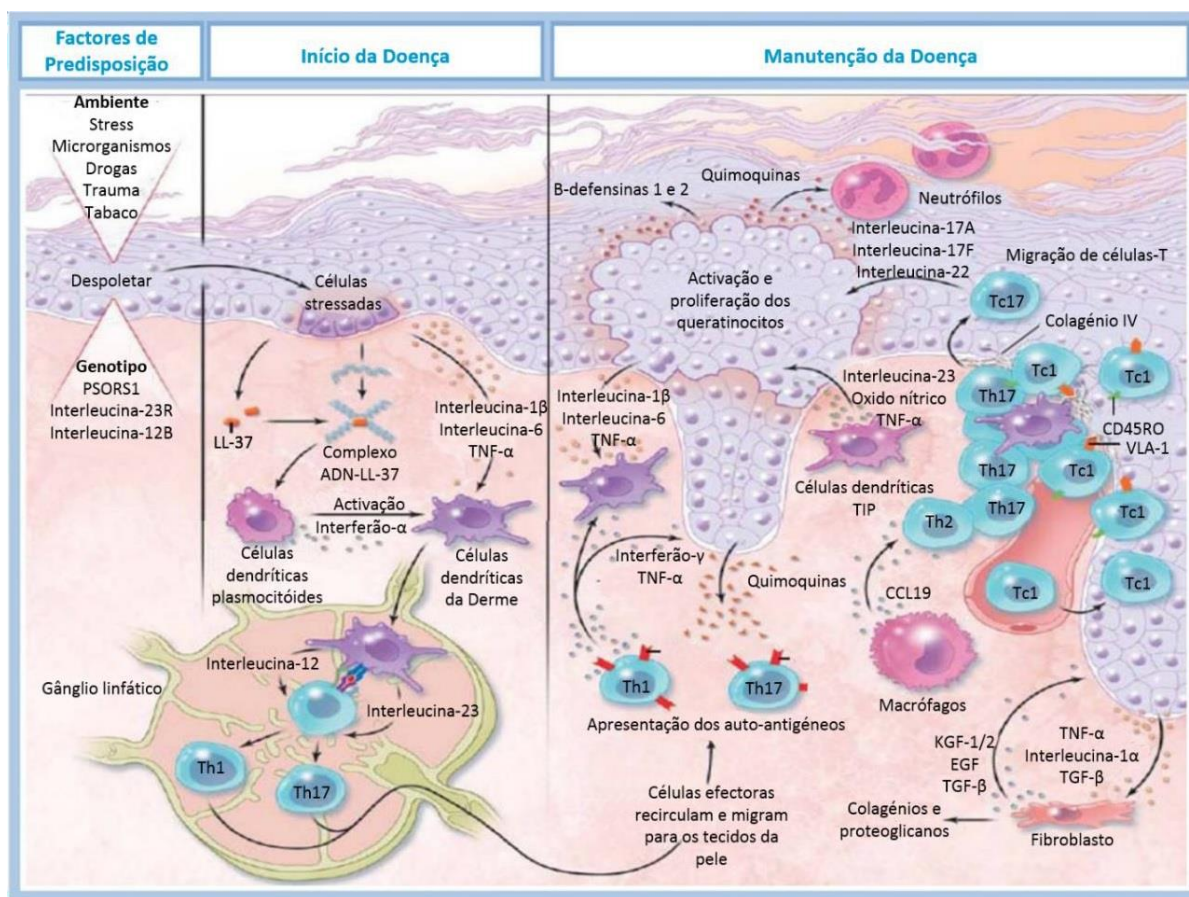
clonal dos linfócitos T. Estas citocinas, IL-12 e IL-23 vão ser responsáveis pela diferenciação em linfócitos Th1 e Th17 respetivamente.<sup>23,25-27</sup>

Na epiderme que os linfócitos Th1 libertam mediadores pró-inflamatória e inúmeras citocinas como o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-22 que, em conjunto com a IL-17 secretada pelas Th17, vão estimular a proliferação e ativação dos queratinócitos e mais tarde contribuir para a manutenção da doença.<sup>26,27</sup>

O transporte das células T da derme para a epiderme é um dos fenómenos imprescindível para o desenvolvimento da psoríase. Este é controlado pela interação da integrina  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 (very late antigen 1-VLA1) nas células T com o colagénio tipo IV na base da membrana da epiderme psoriásica.<sup>27</sup>

Os queratinócitos além de serem uma fonte de péptidos antimicrobianos como as  $\beta$ -defensinas, são responsáveis pela produção de citocinas que modulam o processo inflamatório, como a IL-8, responsável pela quimiotaxia dos neutrófilos, o IFN- $\gamma$ , responsável pela expressão do Complexo de Histocompatibilidade Major classe II (MHCII), e o TNF $\alpha$  que atua a nível dos linfócitos T e macrófagos promovendo a contínua produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias.<sup>25-27</sup>

Deste modo e devido a todo este processo, há a instalação de um processo inflamatório crónico em relação com a hiperproliferação dos queratinócitos, característica da psoríase (Figura 1).



**Figura 1.1.** Esquema da evolução da lesão psoriásica, Adaptado de Sousa 2015<sup>23</sup>

### 1.1.2.2. FATORES GENÉTICOS.

Embora o padrão de hereditariedade da psoríase ainda não esteja completamente descoberto, sabe-se que a predisposição genética exerce um papel importante no seu desenvolvimento. Acredita-se que a transmissão seja multifatorial e poligénica com uma importante agregação familiar.<sup>26,28</sup>

Estudos apontam para que a probabilidade de desenvolver psoríase é maior em familiares de primeiro grau. Indivíduos em que ambos os progenitores sejam portadores de psoríase, apresentam uma predisposição de 40% de probabilidade de vir a desenvolver psoríase. No entanto, em casos que apenas um dos progenitores apresente este diagnóstico clínico, a probabilidade de herança desce para 14%. No entanto caso um dos irmãos seja afetado a probabilidade é de 6%, existindo apenas 2% de probabilidade quando não há antecedentes familiares. Entre irmãos gémeos a incidência de psoríase é de 30% para os dizigóticos e de 65% para os homozigóticos.<sup>25</sup>

A predisposição genética associada para psoríase resulta da presença de antígenos leucocitários humanos (HLA), nomeadamente, HLA-Cw6, HLA-B13, HLA-B17, HLA-Bw57 e HLA-DR4. Destacando-se o HLA-Cw6 que é atualmente considerado o alelo major da doença, ocorrendo em 30-50% dos doentes.<sup>23,27</sup>

Através da análise genética molecular foram identificados 9 loci de suscetibilidade, designados por PSORS e que se diferenciam uns dos outros pela sua numeração 1 ao 9. O PSORS1, definido como o maior determinante genético da psoríase, é um segmento com 220kb (kilobase) e encontra-se no braço curto do cromossoma 6, no Complexo de Histocompatibilidade Major (MHC).<sup>29</sup>

Contudo a ausência de concordância de 100% entre gémeos homozigóticos sugere que, apesar da predisposição genética para a psoríase ser um facto, os fatores ambientais também representam uma forte contribuição no desencadeamento da patologia ou no aparecimento de surtos.

### 1.1.2.3. FATORES AMBIENTAIS

Há fatores de risco ambientais associados à patofisiologia da psoríase, nomeadamente infeções agudas, traumatismos locais repetidos, como feridas ou queimaduras solares, fatores psicológicos, hábitos tabágicos e alcoólicos e determinadas drogas.<sup>6</sup>

Assim, estudos demonstram existir relação entre o clima e o estado da doença, sendo que climas quentes e com luz solar parecem ser benéficos, na maioria dos casos, levando a melhoria dos sintomas, enquanto climas frios aparentam ter efeito oposto.<sup>22</sup>

Outros estímulos ambientais estão descritos como fatores desencadeantes da psoríase, tais como, o tabaco, a ingestão de álcool e a oscilações do estado emocional, de ocorrência repentina.<sup>24</sup> O stresse e as alterações do sistema nervoso estão associados ao início de um novo ciclo psoriático, embora a relação causa-efeito não seja muito clara.<sup>25</sup>

O tabagismo, e o consumo aumentado de álcool também parecem estar interligados à expressão da doença e sua gravidade, no entanto ainda sem mecanismos patológicos plenamente elucidados.<sup>30</sup>

Ao aparecimento das lesões após trauma ou ação de irritantes não específicos sobre a pele, por agentes químicos, físicos ou mecânicos, em pele aparentemente saudável, dá-se o nome de fenómeno de

## INTRODUÇÃO

Koebner. Este corre em cerca de 20% dos doentes com psoríase e é frequente após exposição prolongada ao sol sem proteção, fricção da roupa ou realização de tatuagens. Também estão identificados como fatores precipitantes para o aparecimento de lesões de psoríase a realização de terapêuticas com potencial pró-inflamatório, como a fototerapia e infeções, principalmente infeções do trato respiratório por *Streptococcus*.<sup>6,25</sup>

### 1.1.3. ARTRITE PSORIÁTICA

A psoríase tem várias comorbilidades associadas, mas aquela que se conhece com uma associação mais antiga é a artrite psoriática. Esta é uma doença inflamatória, crónica do sistema músculo-esquelético, que difere da artrite reumatoide, tanto a nível radiológico, como serológico e clínico.<sup>6,31</sup>

Os sintomas mais comuns, reportados são; inflamação e dor nas articulações, assim como entesite e tenossinovite, dores de costas, rigidez matinal, e deformidade das articulações afetadas.<sup>6,32</sup>

A etiopatogenia da artrite psoriática ainda não se encontra totalmente esclarecida, no entanto reconhece-se o papel central dos linfócitos T ativados na etiopatogenia tanto da psoríase como da artrite psoriática. Esta manifesta uma forte predisposição genética, estando associada ao HLA-Cw6, HLA-B27 e HLA-B39.<sup>31,32</sup>

A artrite pode aparecer em doentes sem manifestações cutâneas de psoríase, contudo a presença de alterações ungueais é frequente, nomeadamente o aparecimento de “pitting”.<sup>6</sup> Afeta igualmente homens e mulheres, manifestando-se preferencialmente entre os 30 e 55 anos. Comumente, esta variante surge cerca de 10 anos após a primeira manifestação de psoríase, cerca de 75% dos casos. Em 15% dos casos, a artrite aparece antes das lesões psoriásica, e cerca de 10% concomitantemente com a psoríase.<sup>31</sup>

Sabe-se ainda, que esta condição está presente em 5% dos indivíduos com psoríase gutata e 15% com psoríase em placa.<sup>31</sup>

## 1.2. COMORBILIDADES CARDIOMETABÓLICAS E DOENÇA CARDIOVASCULAR NA PSORIÁSE

Nos últimos anos, a psoríase deixou de ser vista como uma doença exclusivamente cutânea, sendo atualmente considerada uma doença inflamatória sistémica associada a múltiplas comorbilidades, em particular, cardiometabólicas.<sup>33</sup>

A inflamação crónica sistémica associada à psoríase parece ser o elo de ligação entre a esta e a doença cardiovascular, promovendo uma aterosclerose acelerada.<sup>1</sup> De facto, ambas as patologias partilham processos fisiológicos comuns, com a ativação das células Th1 e Th17 e múltiplas citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas que participam na fisiopatogenia da psoríase encontram-se elevadas sistemicamente e correlacionam-se com a gravidade da doença, assim como muitos outros biomarcadores de inflamação sistémica.<sup>33,34</sup> A principal consequência deste estado inflamatório crónico sistémico é o aumento do risco de eventos cardiovasculares, como por exemplo acidente vascular cerebral (AVC) e enfarte agudo do miocárdio (EAM), e de mortalidade cardiovascular, com uma diminuição da esperança média de vida em cerca de 5-6 anos.<sup>35,36</sup>

A associação entre psoríase e doença cardiovascular esta descrita desde os anos 70, e desde então inúmeros trabalhos se tem desenvolvido na tentativa de esclarecer esta relação. Atualmente sabe-se que os doentes psoriásicos têm quase o dobro do risco de doenças cardiovasculares.<sup>1</sup>

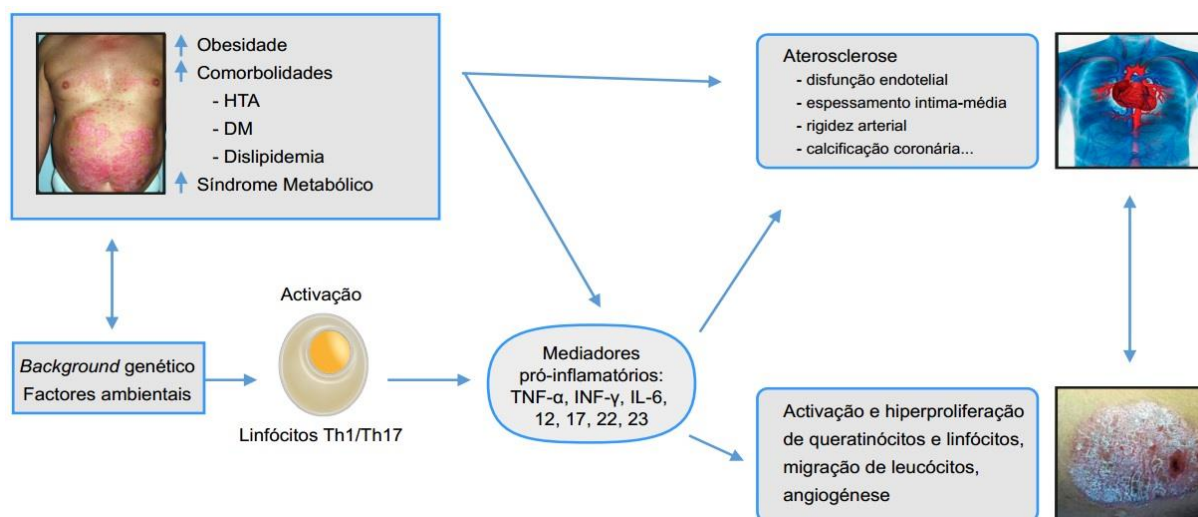
A dúvida que permanece é se a psoríase será, por si só, um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular ou se serão as comorbilidades e comportamentos associados à doença que explicam esta associação. É neste ponto que há mais controvérsia, havendo diversos estudos recentes com conclusões contraditórias.<sup>8,21,37,38</sup>

Uma meta-análise recente, que avaliou um total de 201239 doentes com psoríase ligeira e 17415 doentes com psoríase grave, mostrou que a psoríase (ligeira e grave) se associava a risco significativamente aumentado de EAM, de AVC e de mortalidade cardiovascular, sendo este risco superior nos casos de doença grave. Assim, o risco relativo estimado de EAM na psoríase grave era de 1.70 (95% CI: 1.32-2.48), de AVC de 1.56 (95% CI: 1.32-1.84) e de mortalidade cardiovascular 1.39 (95% CI: 1.11-1.74).<sup>37</sup>

Recentemente, num estudo efetuado com 3603 doentes com psoríase grave foi estimado que a psoríase grave poderá conferir um aumento em 6.2% no Framingham Risk Score (FRS), isto é, no risco de eventos cardiovasculares major a 10 anos.<sup>21</sup>

Embora a razão ainda permaneça desconhecida, será certamente multifatorial, envolvendo fatores genéticos, imunológicos e ambientais. No entanto, o aumento da prevalência e incidência de comorbilidades cardiometabólicas, tais como a hipertensão arterial (HTA), resistência a insulina/diabetes tipo II, dislipidemia, obesidade, tabagismo, síndrome metabólica, nos doentes com psoríase e a inflamação sistémica parecem ser essenciais nesta associação.<sup>1</sup>

O impacto destas comorbilidades cardiometabólicas e aterosclerose acelerada nos doentes psoriásicos é extremamente elevado, não só reduzindo a esperança média de vida como também aumentando o risco de efeitos secundários de várias terapêuticas utilizadas na psoríase.<sup>7</sup>



**Figura 1.2.** Relação entre psoríase, inflamação, comorbilidades cardiovasculares e doença cardiovascular. Adaptado de Torres et al 2013 <sup>7</sup>

## INTRODUÇÃO

### 1.2.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial (HTA) é definida como pressão sanguínea superior a 140/90 mmHg, sendo uma condição extremamente frequente na população mundial. Em Portugal, estima-se que a prevalência de hipertensão seja de 42.1%, dos quais apenas 11.2% estão controlados.<sup>1</sup>

A presença de prevalência aumentada de HTA em doentes com psoríase comparativamente com outros doentes dermatológicos já foi demonstrada em vários estudos.<sup>7</sup> Recentemente numa meta-análise de estudos observacionais, Armstrong et al (2013) demonstraram que o doente com psoríase apresenta um risco de 1.58 vezes superior de desenvolver HTA, do que a população geral.<sup>39</sup>

Embora os mecanismos exatos responsáveis por esta associação ainda permaneçam desconhecidos, estudos apontam para a possibilidade de fatores de risco comuns. Alguns relatam níveis aumentados da enzima conversora de angiotensina e da atividade da renina, que têm como funções regular o tônus vascular e estimular a libertação de citocinas pró-inflamatórias, assim como de endotelina-1, um potente vasoconstritor, bem como o stresse oxidante, que leva a alterações da vasodilatação dependente do endotélio.<sup>1,7</sup> Ainda que por esclarecer, estes poderão constituir importantes fatores responsáveis, pelo menos em parte, do aumento da prevalência de hipertensão arterial em doente com psoríase.

### 1.2.2. RESISTÊNCIA A INSULINA/DIABETES MELLITUS

A prevalência da diabetes mellitus (DM), tipo II, tem vindo a aumentar drasticamente nas últimas décadas. Estudos tem demonstrado uma associação entre psoríase e o aumento dos níveis séricos de glicose, hipoinsulinémia, resistência à insulina e diabetes tipo II.<sup>1</sup>

Vários autores têm demonstrado uma associação entre psoríase e DM II, de forma independente de outros fatores de risco, como por exemplo a obesidade e a dislipidémia. Neimann et al demonstraram que a prevalência de diabetes mellitus tipo II é mais elevada entre psoriásicos (7.1%), mais concretamente entre as formas graves, em comparação com a população em geral (3.3%), mesmo após ajuste do IMC.<sup>40</sup> Deste modo, a resistência à insulina pode ser por si só um fator de risco cardiovascular, independentemente da influência de outras variáveis, como por exemplo a obesidade. Este trabalho a semelhança de outros revela uma forte associação da resistência à insulina/DM II, não só com a psoríase, mas também com o grau de severidade.<sup>41,42</sup>

Esta associação poderá ser explicada por um fundo genético comum, mas também pelo efeito da inflamação sistémica presente na psoríase.<sup>7,42</sup> Boehncke et al mostraram uma associação significativa entre a gravidade da psoríase (PASI) e a secreção de insulina e níveis séricos de resistina, citocina aumentada em estados de resistência à insulina.<sup>42</sup> Por outro lado, o TNF- $\alpha$  uma das principais citocinas pró-inflamatórias da psoríase, na regulação da função da insulina, pode induzir resistência a insulina através da inibição da atividade da cinase de tirosina do recetor de insulina e também pela inibição da secreção de adiponectina pelos adipócitos.<sup>1,7</sup>

Assim, a resistência à insulina observada nos doentes com psoríase grave poderá em parte ser devida à inflamação crónica sistémica observada nestes doentes, conceito cada vez mais aceite. Além disso, estudos genéticos revelaram uma associação entre loci de suscetibilidade da diabetes e a psoríase.<sup>1,7,41</sup>



### 1.2.3. DISLIPIDÉMIA

A psoríase tem vindo a ser associada a alterações adversas do perfil lipídico e do desequilíbrio entre substâncias oxidante e antioxidantes. Existe evidência científica de que a prevalência e incidência da dislipidémia (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) está aumentada nos doentes psoriásicos, suportando a possibilidade destas doenças partilharem vias inflamatórias e genéticas comuns.<sup>43,44</sup>

Vários estudos têm demonstrado uma associação entre psoríase e dislipidémia aterogénica, mesmo quando ajustados à idade, sexo e obesidade.<sup>1,40</sup> Os doentes psoriásicos têm concentrações plasmáticas mais elevadas de triglicédeos, colesterol total, VLDL (*Very low-density lipoprotein*), LDL (*Low-density lipoprotein*), e lipoproteína A e igualmente concentrações séricas baixas de HDL (*High-density lipoprotein*) e apolipoproteína B.<sup>38</sup> Salihbegovic et al, observaram uma prevalência de 62.85% de dislipidémia em doentes com psoríase, assim como uma presença de 39% de hipertrigliceridemia e de 36% de hipercolesterolemia, bem como uma associação significativa entre a gravidade da psoríase (PASI).<sup>43</sup>

Apesar da existência de estudos genéticos que associem estas patologias, a relação fisiopatológica entre elas não está completamente esclarecida, contudo o facto de a psoríase estar associada a obesidade e aumento de tecido adiposo também contribui para a dislipidémia. Toda a via, sabe-se que o excesso de produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptina, características da psoríase, induzem alterações do perfil lipídico.<sup>12</sup> Interessante é também a demonstração de que este perfil dislipidémico se encontra presente desde o início da doença cutânea (< 1 ano) sugerindo que a dislipoproteinémia possa ser determinada geneticamente em vez de adquirida.<sup>7</sup>

Contudo, apesar da existência de estudos genéticos que associem estas patologias, a relação fisiopatológica entre elas não foi ainda totalmente esclarecida, mas provavelmente está relacionada com a produção aumentada de citocinas pro-inflamatórias, principalmente o TNF- $\alpha$ , a leptina e a IL-6, observada nos doentes com psoríase, que têm um papel importante na regulação dos níveis de lípidos, ácidos gordos livres e colesterol.<sup>7</sup>

### 1.2.4. OBESIDADE

A obesidade, há muito que é considerada como um fator de risco cardiovascular, sendo inclusive uma comorbilidade da psoríase. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que na União Europeia, o excesso de peso e a obesidade afetem 30-70% e 10-30% dos adultos, respetivamente.<sup>7,45</sup>

Nos últimos anos vários estudos têm associado a psoríase a uma maior prevalência de excesso de peso ( $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$  e  $< 30 \text{ Kg/m}^2$ ) e obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ ), considerando inclusivamente como uma das comorbilidades mais frequentes.<sup>4,21,40,44</sup> Neimann et al observaram que a prevalência da obesidade em doentes com psoríase severa era de 20.7%, comparativamente com um grupo controlo, 13.2%.<sup>40</sup>

Até ao momento, e apesar da relação estar comprovada, é ainda difícil compreender se a obesidade é a causa ou a consequência de psoríase. Se, por um lado, há estudos que apoiam que a obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento da psoríase, associando inclusivamente o aumento do índice de massa corporal (IMC) ao grau de severidade da doença. Por outro lado, o estado pró-inflamatório característico da psoríase poderá influenciar os processos metabólicos do tecido adiposo, conduzindo ao aumento de peso.<sup>1,7</sup>

## INTRODUÇÃO

De qualquer das formas, a obesidade parece ter um papel central entre a psoríase, a doença cardiovascular e suas comorbilidades, que se deve sobretudo à atividade imunológica e endocrinológica da gordura visceral.<sup>46</sup> O tecido adiposo, para além do armazenamento de energia e da síntese lipídica, é um sistema endócrino ativo que segrega adipocinas, como a leptina e adiponectina, e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Estas moléculas, ao serem libertados em circulação e contribuem para a amplificação do estado inflamatório sistémico já por si só característico da psoríase.

Esta inflamação presente na psoríase, especialmente através do TNF- $\alpha$  e IL-6, parece promover o recrutamento e ativação de macrófagos na gordura visceral com um aumento da produção de TNF- $\alpha$ . Por sua vez, o TNF- $\alpha$  não só induz o estado pró-inflamatório, como também estimula os adipócitos a produzir diversos mediadores inflamatórios. O IL-6 e diversas adipocinas inflamatórias, aumentam e perpetuam a inflamação associada ao excesso de adiposidade.<sup>44,46</sup>

Há evidência de que a perda de peso tem efeito na eficácia das terapêuticas usadas na psoríase, provavelmente devido à diminuição da inflamação associada à perda de gordura visceral.<sup>47</sup>

### 1.2.5. SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica refere-se a um conjunto de fatores de risco de doença cardiovascular que, quando presentes aumentam o risco cardiometabólico. Esses fatores incluem a obesidade, a HTA, a intolerância à glicose e a dislipidémia. Os doentes com esta síndrome metabólica têm um aumento de 3 a 9 vezes do risco de desenvolver diabetes tipo II, de 2-3 vezes de eventos cardiovasculares, nomeadamente EAM e AVC e de 1,5 vezes de mortalidade.<sup>1</sup>

Entre os vários critérios de diagnóstico de síndrome metabólica, o mais aceite e consequentemente o mais utilizado é o da National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III), que o define com a presença de pelo menos 3 das seguintes condições: elevação nos níveis séricos de triglicerídeos ( $\geq 150$  mg/dl ou em tratamento), obesidade abdominal (perímetro da cintura  $> 102$  cm nos homens e  $> 88$  cm nas mulheres), diminuição dos níveis séricos do colesterol HDL ( $< 40$  mg/dl nos homens e  $< 50$  mg/dl nas mulheres, ou em tratamento), elevação da pressão arterial (pressão arterial sistólica  $> 130$  mmHg e pressão arterial diastólica  $> 85$  mmHg, ou em tratamento) e aumento da glicemia em jejum ( $> 110$  mg/dl ou em tratamento).<sup>11</sup>

Os doentes com psoríase têm um risco aumentados de síndrome metabólica e dos seus componentes, como observado em vários estudos.<sup>7,11,12,48,49</sup> Langan et al num trabalho relacionado com esta associação, reportaram, para além da maior prevalência desta síndrome, uma forte associação entre a incidência de obesidade, hipertrigliceridémia e hiperglicemia e o grau de severidade da psoríase, independentemente de presença ou não dos outros componentes.<sup>50</sup> Salihbegovic et al, observaram uma prevalência de 38.57% de síndrome metabólica em doentes com psoríase, assim como uma associação positiva ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.0001$ ) entre o aumento da síndrome metabólica a gravidade da psoríase (PASI).<sup>11</sup>

Tanto a psoríase como a síndrome metabólica partilham um estado pró-inflamatório, manifestando níveis aumentado de TNF- $\alpha$ , IL-6, proteína C reactiva (PCR) e leptina, e níveis mais baixos de anti-inflamatórios, com a adiponectina.<sup>12</sup> A leptina parece ter um papel central nesta ligação, já que foi observado que os doentes com psoríase apresentam níveis séricos elevados de leptina, independente de outros fatores de risco, como a obesidade ou mesmo a síndrome metabólica. Esta proteína de produção específica pelo tecido adiposo, que diminui o apetite e aumento o gasto energético, estimula a

proliferação dos queratinócitos e, simultaneamente, acompanha a secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias da psoríase. Além disso, ela própria parece ser fator de risco independente para distúrbios cardiovasculares, incluindo doença coronária.<sup>12,46,49</sup>

A associação da psoríase com a síndrome metabólica ganha sustento e reforça o conceito de que esta patologia é mais do que uma doença de pele, apresentando um rebote sistêmico capaz de influenciar vias metabólicas preponderantes e com importância no desenvolvimento de condições que aumentam o risco cardiovascular.

### 1.2.6. TABAGISMO

O consumo de tabaco tem sido identificado como um fator de risco para o desenvolvimento e grau de severidade da psoríase.<sup>51</sup> Num trabalho recente, demonstrou-se que o risco de desenvolvimento de psoríase está aumentado em mulheres que fumam ou que fumaram no passado, estando também relacionado com a duração e intensidade do tabagismo.<sup>30</sup>

Apesar de estudos apontarem para um aumento da prevalência de tabagismo entre doentes psoriásicos, este aumento pode ser justificado pelo estado de ansiedade e depressão que se associa frequentemente às agudizações da psoríase, estabelecendo o tabagismo como consequência e não como fator de risco para o desenvolvimento da doença.<sup>7,40</sup>

Embora a relação entre tabaco e aumento do risco de doenças cardiovasculares esteja bem estabelecida, a ligação entre o tabaco e a psoríase necessita de fundamentação. O fumo do cigarro expõe o corpo a substâncias potencialmente tóxicas, como é o caso da nicotina, espécies reativas ao oxigénio e óxido nítrico, substâncias essas que poderão estar envolvidas na patogénese da psoríase.<sup>1</sup>

### 1.2.7. DOENÇAS CARDIOVASCULAR

A associação entre doença cardiovascular e psoríase foi descrita há quase 50 anos, porém só na última década se assistiu a um despoletar do interesse e da investigação por esta área. Inúmeros trabalhos têm surgido com intuito de esclarecer esta relação, e de facto, a psoríase tem sido relacionada com um aumento da mortalidade de causa cardiovascular.<sup>7,21,35</sup>

Os doentes com psoríase têm um risco aumentado de desenvolver doenças aterotrombóticas, independente da existência concomitante de fatores de risco cardiovasculares. Mehta et al. em 2011 estimaram que a psoríase aumenta em 6.2% o risco de eventos cardiovasculares a 10 anos, concluindo que doentes com formas severas têm um risco aumentado de mortalidade cardiovascular, independente dos fatores de risco cardiovascular convencionais.<sup>21</sup> Abuabara et al num estudo caso-controlo, também demonstraram que as formas severas de psoríase estão relacionadas com um maior risco de mortalidade, sendo a doença cardiovascular a etiologia mais comum.<sup>52</sup>

Na última década uma grande quantidade de estudos populacionais comprovou um aumento da prevalência não só de enfarte agudo do miocárdio, mas também de doença cerebrovascular e doença vascular periférica. Assim como constataram que a duração da doença não tem efeito sobre o risco cardiovascular, ao invés do grau de desenvolvimento cutâneo que se associou a um risco aumentado nas faixas etárias mais velhas.<sup>1,4,16,53,54</sup>

## INTRODUÇÃO

Neste contexto, os estudos têm identificado o aumento do risco cardiovascular com base em três hipóteses: o estado inflamatório sistémico que se verifica na psoríase que pode originar ou agravar outras doenças inflamatórias como a aterosclerose; a terapêutica sistémica administrada em doentes com doença moderadas a severa, que pode induzir fatores de risco cardiovasculares como a HTA; e a qualidade de vida ou a adoção de estilos menos saudáveis, uma vez que a psoríase esta associada a uma diminuição da qualidade desta, assim como a depressão e aumento de uso de terapêuticas sistémicas, que interfere na relação psoríase e fatores de risco cardiovascular.<sup>6</sup>

Este risco aumentado de doença cardiovascular em doentes com patologia psoriásica poderá ser explicado por diversos mecanismos, onde a inflamação crónica manifesta um papel importante. Se por um lado a inflamação acelera o desenvolvimento da aterosclerose, podendo ser o fator principal para a doença cardiovascular, por outro, os fatores de risco convencionais, anteriormente bordados, deverão ser equacionados, uma vez que exercem um efeito aditivo.<sup>1,54</sup>

De facto, a inflamação sistémica presente na psoríase parece promover uma aterosclerose acelerada de forma independente, através de disfunção endotelial e stresse oxidante, em muito semelhante à observada noutras doenças inflamatórias crónicas sistémicas como o lúpus eritematoso sistémico.<sup>7</sup>

A aterosclerose partilha características patogénicas comuns a psoríase, nomeadamente a atividade imunológica, o papel da citocina pro-inflamatórias, o compromisso imune de células mediadas Th1, bem como o mesmo padrão de ativação de células T e a expressão de moléculas de adesão.<sup>1</sup> Na psoríase, tal como na aterosclerose ocorre uma desregulação entre Th17/Treg (linfócitos T reguladores), com aumento da expressão de citocinas dependentes dos Th17 por diminuição dos Treg.<sup>7</sup>

Uma vez que o aumento das doenças cardiovasculares em doentes psoriásicos não se encontra completamente compreendido, podendo ser resultado de vários mecanismos. Explorar estes mecanismos permite compreender melhor a relação entre as duas patologias, fornecendo conhecimentos para desenvolver terapêuticas, que previnam ou tratem complicações cardiovasculares em doentes com psoríase.

### 1.3. SOBRECARGA OXIDANTE

As células que compõem os tecidos e órgãos do corpo humano estão constantemente expostas a ataques de natureza oxidativa que podem ter uma fonte endógena (intracelular), como os processos metabólicos ou de sinalização celular, ou exógena, por meio da exposição do organismo a xenobiontes como agentes químicos oxidantes, radiações ionizantes ou luz ultravioleta.<sup>55,56</sup>

Os radicais livres exercem funções importantes no organismo, como por exemplo a nível imunitário e na vasodilatação, contudo se não forem controlados podem ter efeitos nefastos para o organismo, podendo causar alterações em diversos tecidos. Uma das principais lesões oxidantes envolve as espécies reativas de oxigénio (ROS), e estão envolvidas em processos como lesão de DNA (Ácido desoxirribonucleico) e oxidação de lípidos, proteínas e secreção de citocinas inflamatórias.<sup>57</sup>

Entre os radicais livres, responsáveis pelas principais lesões verificadas, encontram-se o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), e os produtos dos seus metabolitos reativos destacam-se o radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), que é o mais reativo, e moléculas não radicais como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o singlete de oxigénio ( $^1O_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ).<sup>58</sup>

De forma a manter o equilíbrio redox, o organismo está dotado de diversos mecanismos de defesa antioxidante. Estes sistemas de defesa envolvem sistemas enzimáticos como superóxido dismutases, a redutase da metahemoglobina, a catalase, peroxidases e transferases e moléculas com ação antioxidante, como o glutationato, a vitamina E e o ácido úrico.<sup>57,59</sup>

Quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e os níveis de radicais livres, com tendência para este último, estamos perante uma situação de stresse oxidante, que se associa a lesão das células e a uma possível resposta inflamatória.<sup>60</sup>

A sobrecarga oxidante tem sido associada ao desenvolvimento de diversas patologias dado poder danificar diversas zonas do organismo. A pele é um potencial alvo para lesão oxidativa, uma vez que é continuamente exposta à radiação UV e outros stresses ambientais gerando ROS. No que concerne, a membrana plasmática das células psoriásicas, esta tem um aumento significativo de ácido araquidónico, que é o substrato natural para a síntese do malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica. Os queratinócitos, por sua vez, expressam a isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico (nNOS/NOS1), e os fibroblastos da derme e outros tipos de células da pele expressam a isoforma endotelial (eNOS/NOS3), sabe-se ainda que sob certas condições, todas as células da pele parecem ser capazes de expressar a isoforma indutível de NOS (iNOS/NOS2). O NO• libertado após irradiação UV desempenha um papel importante na iniciação melanogénese, eritema e imunossupressão. Deste modo, um mecanismo de defesa antioxidante global e integrada da pele é fundamental para proteger este órgão de ROS.<sup>59,61,62</sup>

Sabe-se também que o aumento da expressão de iNOS, inibirá a expressão de eNOS por auto-inibição, que reagirá com ROS em excesso dada a situação de sobrecarga oxidante, formando peroxinitrito, tendo como resultado final a diminuição da biodisponibilidade em NO no endotélio, induzindo a vasoconstrição e consequentemente aumento da pressão arterial.<sup>59,61,63</sup>

Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos nefastos do stresse oxidante se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, bastando para isso restabelecer o equilíbrio normal intracelular. Todavia, se estas perturbações forem em grande escala podem provocar lesões massivas a nível celular associados à peroxidação lipídica e a modificações nas proteínas e ácidos nucleicos, desencadeando a apoptose celular.<sup>58,61</sup>

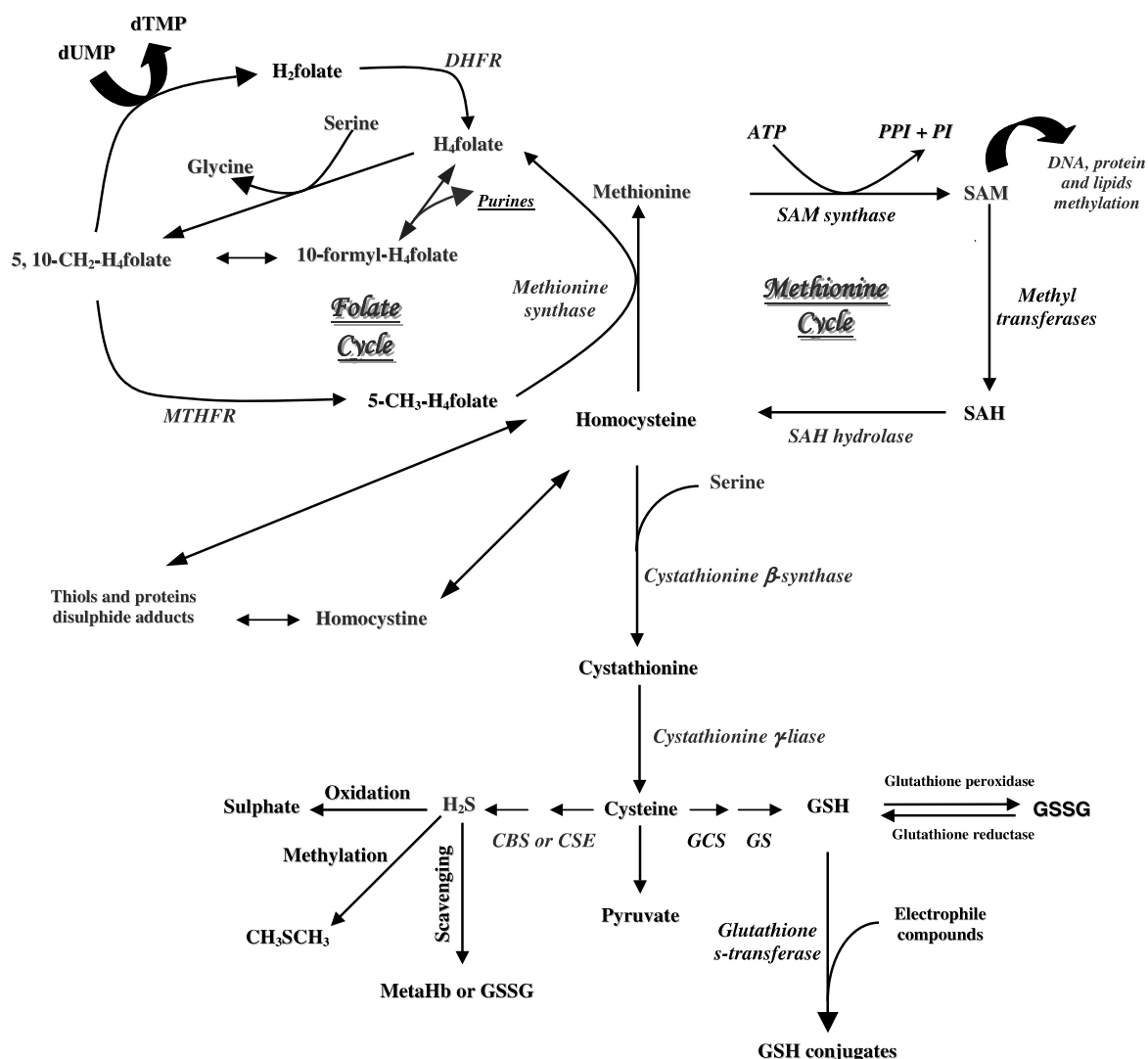
Enquanto que as espécies reativas, entre outros fatores, induzem danos celulares que podem levar à morte celular, uma linha de defesa importante é um sistema de enzimas antioxidantes que atuam em conjunto, inibindo-as. Essa linha de defesa inclui a catálase, glutationato peroxidase, superóxido dismutase e mieloperoxidase, que fazem parte de um sistema de defesa eficaz contra o stresse oxidante.<sup>59,61</sup>. Vários fatores podem ter impacto na efetividade destas enzimas, incluindo alterações na sua estrutura ou ainda a ação de toxinas ou doenças que provocam uma depleção dos seus níveis. A existência de polimorfismos funcionais nos genes que codificam para estas enzimas é igualmente suscetível de alterar a atividade destas, facto que despertou um grande interesse relativamente às doenças que têm sido associadas ao stresse oxidante. Entre elas encontram-se a aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças inflamatórias, alergias, disfunções no sistema imunitário, como por exemplo a psoríase.<sup>58,59,61,63</sup>

#### 1.4. METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um aminoácido homólogo da cisteína, que difere na presença de um grupo metilo adicional antes do grupo tiol. Este grupo adicional permite à molécula formar um anidrido cíclico interno, tiolactato de homocisteína, que precede a formação de ligações peptídicas estáveis.<sup>64</sup>

A homocisteína plasmática pode ser encontrada na forma livre e maioritariamente oxidada, representando entre 20 a 30%, ou ligada a outras proteínas plasmáticas (70-80%), sobretudo à albumina e à hemoglobina.<sup>65</sup> Uma vez que é altamente reativa com proteínas, a homocisteína encontra-se normalmente ligada a estas, degradando a lisinas e a cisteínas, podendo afetar permanentemente funções de proteínas formadas por estes aminoácidos.<sup>64</sup>

O metabolismo da homocisteína encontra-se na interseção de duas vias: a via da remetilação a metionina e a via da transsulfuração a cistationina. Está é obtida a partir da metionina por remoção do grupo metil terminal, estabelecendo ligação ao ciclo do folato e da metionina (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Esquema da via do metabolismo da homocisteína.

Figura 16: Esquema da via do metabolismo da homocisteína. dUMP, monofosfato de uridina; dTMP, monofosfato de timidina; MTHFR, 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase; DHFR, dihidrofolato redutase; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; CBS, cistationina β-sintase; CSE, cistationina γ-liase; GCS, glutamilcisteína sintetase; GS, glutationo sintetase; GST, glutationo S-transferase; GSH, glutationo reduzido; GSSG, glutationo oxidado. Adaptado de Marinho et al., 2007 <sup>66</sup>

Ambas as vias são reguladas pela S-adenosilmetionina (SAM), que atua como um inibidor alósterico da reação da redutase do metilenotetrahidrofolato (MTHFR) e como um ativador da cistationina beta-sintase (CBS). Em condições normais, de equilíbrio entre formação e degradação de homocisteína, cerca de 50% da homocisteína segue a via de remetilação.<sup>67</sup> Por sua vez, quando existe alterações na via da transsulfuração, por exemplo deficiência de folato, leva a hiperhomocisteinemia, ou seja, concentrações de homocisteína elevadas no plasma.

A hiperhomocisteinemia está descrita em pessoas com doença cardiovascular, assim como em pacientes com psoríase, e tem sido associada a um aumento do risco de aterosclerose.<sup>3,68</sup>

Níveis plasmáticos de homocisteína são influenciados por fatores genéticos e pela dieta, principalmente pelo consumo de metionina, ácido fólico e vitaminas B6 e B12.<sup>69</sup> Deste modo, variações genéticas, como a mutação na MTHFR e a dihidrofolato redutase (DHFR), deficiências de ácido fólico e ou vitamina B12, bem como interferência no metabolismo da homocisteína por drogas ou alterações metabólicas, são as causas mais frequentes de hiperhomocisteinemia.

O aumento da concentração plasmática do aminoácido pode causar lesões no endotélio, resultando em aterosclerose, uma vez que é responsável pela:<sup>69</sup>

- Auto-oxidação em homocisteína, produzindo radicais livres nas células endoteliais, como ião superóxido e peróxido de hidrogênio, por oxidação do grupo sulfidril do aminoácido;<sup>70</sup>
- Alteração dos níveis de fator de coagulação e consequente alterações dos mecanismos de coagulação com aumento da formação de coágulos;<sup>71</sup>
- Indução da proliferação de células musculares lisas da parede arterial aumentando a síntese de DNA, tendo o efeito oposto nas células endoteliais;<sup>72</sup>
- Captação do NO diretamente formando S-nitrosohomocisteína;<sup>73</sup>
- Aumento dos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno do eNOS;<sup>69</sup>
- Hipometilação de DNA;<sup>74</sup>
- Aumento do stresse do retículo endoplasmático, que envolve disrupções no folding e processamento de proteínas recém-sintetizadas no retículo endoplasmático.<sup>75</sup>

Estes efeitos resultam em diversas complicações, incluindo degeneração celular, lesão da íntima arterial, crescimento celular, formação de tecido conjuntivo (fibrose) e deposição de lipoproteínas em placas ateroscleróticas.<sup>69</sup>

Os pacientes com psoríase têm níveis mais baixos de folato em comparação com controles normais, como demonstrado num estudo caso controle.<sup>3</sup> O consumo excessivo de folato usada para metilação de DNA nos queratinócitos que se dividem ativamente, nesta patologia, reduz deste modo os níveis de folato. Num outro estudo, níveis de homocisteína estão elevados em psoriásicos, tendo-se verificados num outro estudo uma correlação direta com a gravidade da doença e uma inversa com os níveis de folato no plasma.

Deste modo, em doentes com psoríase grave, onde se verifica grandes áreas de renovação rápida da pele e aumento da atividade de queratinócitos, há um consumo excessivo de folato. Isto por sua vez resulta

## INTRODUÇÃO

em reduzida desagregação e níveis séricos elevados de homocisteína com todos os seus efeitos adversos.<sup>76</sup>

Em suma, os psoriásicos têm níveis mais baixos de folato e níveis mais elevados de homocisteína do que os controles normais. Uma vez que, a psoríase está associada a um risco aumentado de morbidade e mortalidade cardiovascular, e homocisteína é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, gerir este fator de risco terá efeitos benéficos em termos de morbidade e mortalidade cardiovascular.<sup>3,76,77</sup>

### 1.5. BIOMARCADORES

#### 1.5.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS

##### 1.5.1.1. SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL

A sintase do óxido nítrico (NOS), consiste em enzimas hémicos encarregues da produção de NO no organismo, para as suas diversas funções. Esta enzima apresenta diversas isoformas, entre elas a eNOS (Sintase do óxido nítrico endotelial), localizada no endotélio, onde o NO gerado desempenha funções na vasodilatação.<sup>78</sup>

O gene que codifica eNOS localiza-se na região 7q35-3 do cromossoma 7, compreende 26 exões, apresentando um comprimento total de 21Kb e produz uma proteína com cerca de 1203 aminoácidos.<sup>79</sup> Desde a sua caracterização em 1990 diversas variações alélicas do gene tem sido identificadas e avaliadas quanto a possíveis ligações cardiovasculares.<sup>80</sup>

Um dos polimorfismos como maior relevância é o 4b/a no intrão 4 variable number tandem repeat (VNTR), baseia na repetição de 27 pares de base (pb). O alelo 4a, o alelo menor, têm 4 repetições (as duas primeiras com base A e as duas ultimas com a base G), por sua vez o alelo maior, 4b apresenta 5 repetições (3 repetições A e 2 G).<sup>79-81</sup>

Atualmente sabe-se que a expressão desta mutação, está associada a redução da atividade da eNOS, comprometendo a síntese do NO, e que esta pode modular eventos como angiogénese, apoptose, ciclo celular, invasão e metástase.<sup>82</sup> Além disso os polimorfismos do gene eNOS foram descritos como fatores de risco para o desenvolvimento da psoríase.<sup>83</sup>

##### 1.5.1.2. ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

A enzima conversor da angiotensina (ECA) é uma enzima importante no sistema renina-angiotensina, pois tem um papel chave na regulação da pressão sanguínea por catalisar a conversão de angiotensina I em angiotensina II, que é um potente vasoconstritor. A angiotensina II foi identificada como um importante indutor da produção de ROS.<sup>84-86</sup>

O gene ECA humano localiza-se no cromossoma 17q23 e caracteriza-se por apresentar 24 intrões, do qual já são conhecidos vários polimorfismos, entre eles o de inserção/deleção (I/D).<sup>87</sup>



O polimorfismo ECA I/D, localiza-se no intrão 16, e reflete a presença (I) ou ausência (D) de um a sequência Alu de 287 pb. O alelo D tem sido associado a uma maior atividade sérica da ECA e a um maior risco de ocorrência de enfarte do miocárdio e insuficiência cardíaca.<sup>88</sup> Estima-se que o alelo D contribua aproximadamente para metade da variação dos níveis plasmáticos de ECA o que pode explicar a diversidade de resposta à inibição da ECA, em diferentes pacientes.<sup>87,89</sup> Alguns estudos sugerem que o gene da ECA pode ser um fator genético que contribui para a hereditariedade da suscetibilidade a psoríase.

### 1.5.1.3. REDUTASE DA DIHIDROFOLATO

A redutase do dihidrofolato (DHFR) é uma importante enzima do ciclo do folato, responsável pela redução da dihidrofolato a tetrahydrofolato, dependente do NADPH (dinucleotídeo reduzido da nicotinamida adenina). Esta enzima encontra-se distribuído por todos os organismos, desempenhando um papel crucial na regulação da concentração de tetrahydrofolato celular.<sup>90</sup> O DHFR catalisa a redução do ácido fólico para dihidrofolato e posteriormente, em tetrahydrofolato. O tetrahydrofolato e compostos derivados do folato são essenciais para a síntese das purinas, elementos fundamentais para a síntese do DNA celular, e para a remetilação da homocisteína.<sup>91,92</sup>

Uma vez a DHFR é imprescindível no metabolismo do folato/homocisteína, as alterações na sua expressão génica podem afetar a suscetibilidade a várias doenças dependentes do *status* de folato, como a por exemplo a psoríase.<sup>3,92,93</sup>

O gene da DHFR localiza-se no cromossoma 5, no braço longo, na região 11.2-13.2 (5q11.2-q13.2), compreende 6 exões, apresentando um comprimento de 30 Kb.<sup>93</sup>

Dos polimorfismos da DHFR identificados, um dos mais estudado consiste numa deleção de 19 pb no intrão 1. O genótipo del/del está associado a uma concentração mais baixa de homocisteína no plasma.<sup>93</sup> A deleção no gene da DHFR parece eliminar um local de ligação de fatores de transcrição ou afetar um local de splicing. O genótipo del/del resulta num aumento da expressão da DHFR e consequentemente, um aumento da remetilação da homocisteína e da quantidade do folato nos eritrócitos. Indivíduos homozigóticos para este polimorfismo tem concentrações de homocisteína mais baixas que os heterozigóticos.<sup>90,93</sup>

### 1.5.1.4. REDUTASE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO

A redutase da metileno-tetrahydrofolato (MTHFR) é uma flavoproteína homodimérica responsável pela síntese de 5-metil-tetrahydrofolato (5-MTHF), o principal dador de metilo na remetilação da homocisteína a metionina.<sup>94</sup> Esta enzima é responsável pela utilização do folato na sua forma biológica, tanto para a remetilação como para a síntese de DNA.<sup>95</sup>

O gene que codifica a MTHFR encontra-se na região 1p36.3 do cromossoma 1, cada subunidade do MTHFR contém um domínio catalítico N-terminal de 40kDa e um domínio regulatório C-terminal de 37kDa.<sup>96</sup>

Na posição 677 do gene MTHFR observou-se uma mutação de substituição de uma citosina (C) por uma timina (T), polimorfismo C677T, que pode conduzir a uma hiperhomocisteinemia, principalmente na

## INTRODUÇÃO

presença do genótipo TT e em baixas concentrações de folato.<sup>97</sup> Esta mutação é responsável pela substituição do aminoácido valina por alanina, sendo um fator genético de risco para a doença cardiovascular.

Esta substituição dá origem a uma forma termolábil do MTHFR que apresenta menor atividade catalítica, variante TT, contudo esta situação pode ser estabilizada pelo consumo de folato, que força a reação do MTHFR no sentido de formação de metionina.<sup>96</sup> Observou-se também que concentrações elevadas de homocisteína e baixas concentrações de folato podem induzir uma condição inflamatória, sendo esta verificada em situações de baixo consumo de vitamina B e folato na dieta.<sup>65</sup> Deste modo a variante TT com menor atividade, esta associada com risco aumentado de doença cardiovascular e com aumento da concentração de homocisteína plasmática total<sup>96</sup>, sendo considerável o estudo em doentes com psoríase.

### 1.5.1.5. MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima lisossômica, expressa predominante nos em monócitos, macrófagos e em maior quantidade em neutrófilos, nos locais de inflamação, durante a fagocitose.<sup>98,99</sup> Consiste numa enzima dimérica de aproximadamente 150 kDa (unidade de massa atômica), formado por duas cadeias leves e 2 cadeias pesadas glicolisadas ligadas a um grupo heme prostético.<sup>98,100</sup>

A MPO após ativada, catalisa a reação entre o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o anião cloreto (Cl<sup>-</sup>), originando ácido hipocloroso (HOCl) e outros ROS, que em situações fisiológicas conduzem à atividade bactericida contra uma ampla variedade de microrganismos durante a resposta imune inata. A MPO e os seus produtos reativos associados ao stresse oxidante, conduzem à modificação oxidativa de bases de DNA e inibem mecanismos de reparação de DNA.<sup>101</sup>

O gene que codifica para a enzima MPO localiza-se no braço longo do cromossoma 17 na posição 23.1 (17q23.1), e é constituído por 12 exões e 11 exões, correspondente a um tamanho de 11080 pb.<sup>102</sup> Dos vários polimorfismos identificados neste gene, o mais comum é -463G>A (rs2333227), identificado a 463pb a montante do gene de MPO na região promotora, onde se liga ao fator de transcrição SP1 (specificity protein 1).<sup>103,104</sup>

O polimorfismo G463A caracteriza-se pela substituição de um nucleótido de guanina (G) por um de adenina (A), na posição 463. O alelo G funciona como um local de ligação do fator de transcrição, que reage com o SP1 para aumentar a atividade transcricional da MPO. A troca de nucleótido G para A está associada a uma menor atividade transcricional do gene, uma vez que este tem uma menor afinidade de ligação. A baixa atividade do alelo A foi associado a uma menor produção de ROS, diminuindo a incidência de várias doenças, nomeadamente as doenças cardiovasculares e cancro do pulmão.<sup>100,103</sup>

A presença de MPO em situações de stresse oxidante e de processos inflamatórios faz desta enzima um alvo de estudo como marcador para instabilidade da placa aterosclerótica e na avaliação de pacientes com doença cardiovascular, especialmente se associada a psoríase.<sup>105</sup>

### 1.5.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

#### 1.5.2.1. REDUTASE TRANSMEMBRANAR DO ERITRÓCITO

A redutase transmembranar (RTM) é componente de um sistema redox transmembranar presente em todas as células, observando -se nos eritrócitos as atividades mais elevadas.<sup>106</sup>

O eritrócito, devido a sua função de transporte de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> encontra-se exposto a fontes de ROS. Uma vez que não apresenta núcleo ou mitocôndrias, não pode voltar a sintetizar nenhuma enzima antioxidante, sendo a sua estabilidade e capacidade antioxidante assegurada através do transporte membranar de elétrons, cujos aceptadores fisiológicos dos sistemas de transporte são pouco conhecidos. Deste modo, o estudo deste sistema é efetuado com aceptadores eletrônicos não fisiológicos que não atravessem a membrana plasmática, como por exemplo o ferricianeto.<sup>63</sup>

A RTM transfere elétrons do NADH intracelular para oxidantes externos não permeantes como o ferricianeto, através de vias ligadas a processos metabólicos na célula. A redução de ferricianeto a ferrocianeto pelos eritrócitos humanos.<sup>107</sup>

Esta enzima glicoproteica reduz o anião ferricianeto de potássio extracelular, na dependência do NADH produzido pela glicólise, estando envolvida nos processos de controlo de stress oxidativo, metabolismo glicolítico, bem como nos processos de apoptose e envelhecimento celular.<sup>107,108</sup>

Assim sendo, RTM desempenha uma função importante na manutenção do equilíbrio redox do eritrócito, visto ser responsável pela remoção de elétrons ao nível da membrana, por conseguinte, a diminuição da sua atividade resulta no aumento da sobrecarga oxidante na célula.<sup>109</sup>

#### 1.5.2.1. ATIVIDADE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

Com referido anteriormente a ECA é uma enzima importante no sistema renina-angiotensina, responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina II, em que a atividade ou degradação desta influencia profundamente todo o eixo renina-angiotensina.

A ECA circulante pode ser avaliado em relação a sua concentração, assim como a atividade, face a um substrato específico. A atividade tem-se demonstrado um parâmetro mais relevante que a concentração, uma vez que estas duas variáveis podem não ser proporcionais. Apesar de, na ausência de moduladores da ECA a concentração da enzima seja proporcional à sua atividade, na presença de inibidores a concentração da enzima é superior e a atividade inferior, enquanto que na presença de ativadores a concentração pode não variar ao contrário da atividade da ECA que pode ser superior.<sup>84,85,110,111</sup>

Para determinar atividade da ECA utiliza-se como substrato o FAPGG (N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly), um pentapéptido específico para a ECA, cuja absorvência no ultravioleta decresce ao ser convertido a produto. Esta atividade sérica é calculada recorrendo a lei de Lambert-Beer.<sup>112</sup>

Os níveis plasmáticos de ECA são também influenciados, como referido anteriormente, pelo genótipo o que em parte explica a diversidade de resposta à inibição da ECA, em diferentes pacientes.<sup>85,88</sup> Uma vez que a ECA converte a angiotensina I em angiotensina II, que por sua vez degrada a bradicinina, um

## INTRODUÇÃO

péptido vasodilatador, a redução nos níveis de ECA poderá aumentar a bradicinina, e desencadear uma resposta inflamatória, o que induzir o desenvolvimento de psoríase.<sup>87,89</sup>

Estima-se que o alelo D contribua aproximadamente para metade da variação dos níveis plasmáticos de ECA o que pode explicar a diversidade de resposta à inibição da ECA, em diferentes pacientes.<sup>88</sup>

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVO

A psoríase é uma doença crônica, autoimune que se manifesta na pele, sendo atualmente considerada também uma doença inflamatória sistêmica, associada a diversas comorbidades. Doentes com esta patologia têm um risco aumentado de desenvolver diversas comorbidades cardiovasculares, de entre as quais HTA.

Os objetivos gerais deste trabalho foram estudar e avaliar a existência de biomarcadores genéticos e/ou bioquímicos associados ao processo inflamatório, compartilhados pela psoríase e doença cardiovascular.

Neste sentido, os objetivos específicos foram:

- Determinar os polimorfismos genéticos *NOS3* 4b/a (SNP repetição), *ECA* (I/D) (SNP de inserção), *DHFR* ins/del (SNP de inserção), *MTHFR* C/T (rs1801133) e *MPO* G/A (rs2333227) em indivíduos com psoríase e em indivíduos sem esta patologia;
- Analisar atividades enzimáticas no eritrócito e no soro, nomeadamente a redutase transmembranar, fosfatase acida, redutase metahemoglobina, e atividade da enzima conversor de angiotensina, envolvidas na resposta inflamatória da psoríase;
- Analisar o efeito da interação do genótipo-fenótipo envolvidos na patofisiologia e comorbilidade cardiovasculares dos doentes com psoríase.





## **MATERIAIS E MÉTODOS**



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. POPULAÇÃO EM ESTUDO**

O presente estudo inclui indivíduos com doença psoriásica seguidos no serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria. Foram estudados 63 indivíduos com psoríase, sendo a maioria do sexo masculino (69.8%) e com idades compreendidas entre os 28 e os 86 anos.

Como controlo foram consideradas dois grupos (N=358) sem a patologia, e com idade média de 49 anos: uma amostra com 94 homens (33.6%), cedida pelo Professor Doutor Mário Rui Mascarenhas, seguidos na Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa Lda.; uma amostra de doadores, com 142 homens (50.7%), recrutados no Instituto Português do Sangue.

Do grupo controlo foram caracterizados quanto à HTA 82 indivíduos, com média de idade 61, 33(40.2%) do sexo masculino, os quais irão constituir um subgrupo com risco cardiovascular.

Para todos os indivíduos foram obtidos consentimentos informados por escrito, cumprindo os critérios da Declaração de Helsínquia (anexo 2).

#### **3.2. COLHEITA E PROCESSAMENTO DE SANGUE PERIFÉRICO**

Para o presente estudo foram colhidas amostras de sangue periférico em tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e tubo seco, devidamente identificados.

Após a colheita, parte do sangue total colhido, cerca de 2ml, foi conservado a -20°C, para posterior extração de DNA, o excedente (tubo EDTA e seco) foram centrifugados 2000 rpm durante 10 minutos à 4°C. O plasma e soro foram alíquotas e conservados a -20°C, para posteriores doseamentos.

No que refere aos glóbulos vermelhos, parte foi usada para determinar a atividade da Redutase Transmembranar (RTM) e o restante foi diluído numa solução de mercapto-etanol a 1/40, para, posterior determinação das atividades da Fosfatase Ácida eritrocitária (FA) e da Redutase da Metahemoglobina (RMHb).

#### **3.3. REDUTASE TRANSMEMBRANAR DO ERITRÓCITO**

A atividade deste complexo enzimático foi determinada segundo o descrito por Marques *et al.*, 1997<sup>107</sup> em eritrócitos intacto, onde o ferricianeto é convertido a ferrocianeto por ação da redutase transmembranar dos eritrócitos, tendo sido medida a sua atividade por espectrofotometria a 535 nm.

### 3.4. REDUTASE DA METAHEMOGLOBINA DO ERITRÓCITO

A atividade da Redutase da Metahemoglobina foi determinada por espectrofotometria a 340 nm durante a oxidação da dinucleotídeo reduzido da nicotinamida adenina (NADH) pelo método de Board modificado.<sup>113</sup>

### 3.5. FOSFATASE ÁCIDA DO ERITRÓCITO

A atividade da fosfatase ácida eritrocitária foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm durante a hidrólise do para-nitrofenilfosfato (pNPP) a para-nitrofenol (pNP) como descrito por Marques et al., 1999 e 2000.<sup>106,114</sup>

### 3.6. ATIVIDADE DA ENZIMA CONVERSOR DE ANGIOTENSINA

A atividade da ECA sérico foi determinada espectrofotometricamente a 37°C, seguindo o decréscimo de absorvência a 346nm do FAPGG durante 15 min, adaptado de Faure-Delanef et al 1998.<sup>112</sup>

### 3.7. EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO

A extração não enzimática de DNA foi realizada a partir de sangue total utilizando o método de salting-out adaptado do método de Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. 1991.<sup>115</sup>

### 3.8. QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA PUREZA DO DNA

A quantificação e determinação da pureza do DNA genômico foram determinadas espectrofotometricamente no NanoDrop® (ND-2000, Thermo Scientific) tendo como referência a solução de TE. A concentração é expressa por ng/μl e o grau de pureza é a razão entre absorvências a 260 e 280 nm.

### 3.9. VARIANTES GENÉTICAS ESTUDADAS

As variantes genéticas estudadas foram: referentes ao polimorfismo de inserção/deleção do gene *ECA*, caracterizado pela presença ou ausência de uma sequência *Alu* de 287pb, no intrão 16, do gene *DHFR*, também caracterizado pela inserção ou deleção de uma sequência de 19 pb no intrão 1, o polimorfismo de repetição de 27 pb no intrão 4 do gene *eNOS*, assim como, o polimorfismo *MPO*, caracterizado pela alteração de uma guanina (G) numa adenina (A), na posição 463.

No que refere aos polimorfismos *MTHFR* e *COMT*, os resultados foram cedidos pelo laboratório de genética, tendo sido determinados por outros alunos.

**Tabela 3.1.** Polimorfismos genéticos analisados, localização no cromossoma e respetivas alterações

| Polimorfismo                          | Cromossoma     | Substituição              | Alelos            |
|---------------------------------------|----------------|---------------------------|-------------------|
| <i>eNOS/NOS3</i> 27pb (SNP repetição) | 7q35-36        | 27pb intrão 4             | b:a               |
| <i>ECA (I/D)</i> (SNP de inserção)    | 17q23          | <i>Alu</i> 287pb intrão16 | Deleção: inserção |
| <i>DHFR</i> 19-bp (SNP de inserção)   | 5q11.2-13.2    | 19pb intrão 1             | Deleção: inserção |
| <i>MPO G463A</i> (rs2333227)          | 17q23.1        | 463                       | G:A               |
| <i>MTHFR C677T</i> (rs1801133)        | 1p36.3         | 667                       | C:T               |
| <i>COMT Val158Met</i> (rs165599)      | 22q11.1-q11.12 | 158                       | G:A               |

SNP, single nucleotide polymorphism; Alelos, ancestral:mutante; Substituição, posição da alteração; n.a., não aplicável.

### 3.9.1.DETERMINAÇÃO GENÉTICA

A análise do polimorfismo 4 b/a da *NOS3*, bem como inserção/deleção da *ECA* e da *DHFR* foi realizada por PCR (reação de polimerização em cadeia). No que diz respeito ao polimorfismo da *MPO* foi analisado PCR-RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphism*) em que os fragmentos amplificados (produtos de PCR) foram posteriormente digeridos por uma enzima de restrição, *SsiI* (*AciI*)

Esta técnica permite que uma zona específica do genoma seja multiplicada milhares de vezes, partindo de um conhecimento prévio da região de interesse a amplificar. Para tal foi utilizado o termociclador 2720 Thermal Cycler da Applied Biosystems, de acordo com as condições apresentadas na tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Resumo das condições de amplificação utilizadas para determinação do genótipo dos polimorfismos.

| Polimorfismo | Condições PCR              | Componentes PCR        |
|--------------|----------------------------|------------------------|
| <i>NOS3</i>  | 35 ciclos                  | DNA: 10 µl (200ng)     |
|              | Desnaturação: 30s a 94°C   | Primer F: 1µl, 10 pmol |
|              | Anneling: 30s a 53°C       | Primer R: 1ul, 10 pmol |
|              | Extensão: 45s a 72°C       | Master Mix: 12,5 µl    |
|              | Extensão final: 5 min 72°C | H2O: 0,5 µl            |
| <i>ECA</i>   | 35 ciclos                  | DNA: 10 µl (200ng)     |
|              | Desnaturação: 45s a 94°C   | Primer F: 1µl, 10 pmol |
|              | Anneling: 45s a 58°C       | Primer R: 1ul, 10 pmol |
|              | Extensão: 45s a 72°C       | Master Mix: 12,5 µl    |
|              | Extensão final: 32s 72°C   | DMSO: 1,25 µl          |
| <i>DHFR</i>  | 35 ciclos                  | DNA: 10 µl (200ng)     |
|              | Desnaturação: 30s a 94°C   | Primer F: 1µl, 10 pmol |
|              | Anneling: 30s a 60°C       | Primer R: 1ul, 10 pmol |
|              | Extensão: 45s a 72°C       | Master Mix: 12,5 µl    |
|              | Extensão final: 7min 72°C  | H2O: 0,5 µl            |
| <i>MPO</i>   | 35 ciclos                  | DNA: 10 µl (200ng)     |
|              | Desnaturação: 60s a 94°C   | Primer F: 1µl, 20 pmol |
|              | Anneling: 60s a 59°C       | Primer R: 1ul, 20 pmol |
|              | Extensão: 60s a 72°C       | Master Mix: 25 µl      |
|              | Extensão final: 7 min 72°C | H2O: 13 µl             |

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose previamente corado com brometo de etídio e as bandas visualizadas por fluorescência à luz UV num transiluminador (Genosmart, VWR). A metodologia utilizada para a separação dos diversos fragmentos encontra-se na tabela 3.3.

A análise dos resultados foi realizada utilizando um marcador molecular de 50 pb (Invitrogen) e um controlo negativo contendo 10µL de água desionizada (sem adição de ADN).

**Tabela 3.3.** Resumo das condições utilizadas na eletroforese para determinação dos genótipos das variantes genéticas analisadas

| Polimorfismo | Condições do gel       | Genótipo possível           |
|--------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>NOS3</i>  | 3%/ 110 volts/ 120 min | <b>a/a</b> - 393 pb         |
|              |                        | <b>a/b</b> - 393+420 pb     |
|              |                        | <b>b/b</b> - 420 pb         |
| <i>ECA</i>   | 2%/ 110 volts/ 60 min  | <b>II</b> - 477 pb          |
|              |                        | <b>ID</b> - 477+190 pb      |
|              |                        | <b>DD</b> - 190 pb          |
| <i>DHFR</i>  | 4%/ 110 volts/ 60 min  | <b>ins</b> - 144 pb         |
|              |                        | <b>ins/del</b> - 144+125 pb |
|              |                        | <b>del</b> - 125 pb         |
| <i>MPO</i>   | 3%/ 110 volts/ 80 min  | <b>GG</b> - 169 120 61      |
|              |                        | <b>GA</b> - 289+169+120+61  |
|              |                        | <b>AA</b> - 289+61          |

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genotípicas observadas foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) com o qui-quadrado. Este teste também foi utilizado para avaliar o significado estatístico das diferenças entre as frequências dos grupos de estudo.

Todas as variáveis contínuas foram testadas para a normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida procedeu-se a um T-teste para avaliar as diferenças entre as populações. Os parâmetros bioquímicos e as atividades enzimáticas foram correlacionados entre si, e entre as populações, tendo em conta a normalidade, testes paramétricos, correlação de Pearson ou não-paramétricos, correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada no programa SPSS 21.0 tendo os valores  $p < 0.05$  considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA PSORIÁSICA

As características gerais clínicas da população psoriásica que integrou este estudo, encontram-se descritas na tabela 4.1. Esta caracterização tem conta a idade, a idade de diagnóstico, a gravidade e a morfologia, desta patologia.

A população psoriásica que integra este estudo apresenta uma média de idade de 52 anos, com uma percentagem de 69.8% de indivíduos do sexo masculino. No que refere a idade de diagnóstico, apenas se obteve informação de 36 doentes, destes 24 apresentaram idade de diagnóstico antes dos 40 anos. Relativamente a morfologia 93.5% dos doentes manifesta psoríase em placas, ou vulgar, e não há nenhum caso da forma inversa relatados, porém a nível da gravidade, avaliada pelo índice PASI, a população de psoríase encontra-se maioritariamente (61.3%) com PASI ligeiro, apenas 38.7% apresentaram psoríase moderada a grave.

Quanto a uma das comorbilidades mais antigas associada a psoríase, a artrite psoriásica, está presente em 27 dos doentes que foram incluídos neste estudo.

**Tabela 4.1.** Características gerais clínicas da população psoriásica

|                           | <b>Psoríase</b><br><i>N</i> = 63 |
|---------------------------|----------------------------------|
| <b>Sexo</b>               |                                  |
| Feminino                  | 19 (30.2%)                       |
| Masculino                 | 44(69.8%)                        |
| <b>Idade</b>              | 52.1±12.9                        |
| <b>Idade diagnóstico</b>  |                                  |
| ≤ 40                      | 24 (64.7%)                       |
| > 40                      | 12 (33.3%)                       |
| <b>PASI</b>               |                                  |
| PASI<10                   | 24 (38.7%)                       |
| PASI≥10                   | 38 (61.3%)                       |
| <b>Tipo Psoríase</b>      |                                  |
| Placas                    | 58 (93.5%)                       |
| Inversa                   | 0 (0.0%)                         |
| Gutata                    | 1 (1.6%)                         |
| Pustular                  | 2 (3.2%)                         |
| Eritrodémica              | 1 (1.6%)                         |
| <b>Artrite Psoriásica</b> | 27 (42.9%)                       |

Valores apresentados referem-se a frequências absolutas (frequências relativas, %); Idade de diagnóstico foi categorizado aparecimento depois dos 40 anos idade (≤ 40) e aparecimento antes dos 40 anos idade; (> 40); PASI, Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase caracterizado em ligeira (PASI<10) e moderada ou grave (PASI≥10).

Quando foi analisada a população psoriásica tendo em conta o PASI, as características clínicas e demográficas não apresentaram diferenças significativas ( $P<0.05$ ), contudo para alguns parâmetros bioquímicos foram encontradas algumas diferenças (tabela 4.2). Assim sendo, verificou-se uma tendência, para os parâmetros com o volume globular médio (VGM), o potássio, a fosfatase alcalina, as proteínas totais e o colesterol total, e diferenças significativas para a bilirrubina total e direta e colesterol das LDL, ( $P<0.05$ ). Deste modo nos indivíduos com psoríase moderada a grave, apresentam valores mais elevados de colesterol LDL, bilirrubina total e direta e ECA séricos com valores mais elevados, ao

## RESULTADOS

invés do sódio que apresenta valores mais baixos. Quanto aos restantes parâmetros analíticos correntes, não apresentados, não se verificou diferenças significativas.

As atividades do eritrócito, das enzimas fosfatase ácida (FA), redutase da metahemoglobina (RMHb), e redutase transmembranar (RTM), estas não apresentam diferenças significativas, quando comparadas com o índice gravidade da psoríase.

**Tabela 4.2.** Características da população psoriásica segundo o índice de gravidade (PASI).

|                           | <b>PASI &lt;10</b><br><i>N</i> =24 | <b>PASI ≥10</b><br><i>N</i> =38 | <b>P</b>     |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>Sexo</b>               |                                    |                                 |              |
| Feminino                  | 11 (29.7%)                         | 7 (29.9%)                       | 0.962        |
| Masculino                 | 26 (70.3%)                         | 17 (70.8%)                      |              |
| <b>Idade</b>              | 54.24±12.0                         | 48.88±14.1                      | 0.122        |
| <b>Idade diagnostico</b>  |                                    |                                 |              |
| ≤ 40                      | 15 (71.4%)                         | 10 (71.4%)                      | 1.000        |
| > 40                      | 6 (28.6%)                          | 4 (28.6%)                       |              |
| <b>Artrite Psoriásica</b> |                                    |                                 |              |
| Não                       | 21 (56.8%)                         | 13 (54.2%)                      | 0.842        |
| Sim                       | 16 (43.2%)                         | 11 (45.8%)                      |              |
| <b>VGM</b>                | 91.4±5.8                           | 89.7±3.7                        | 0.063        |
| <b>Fosfatase alcalina</b> | 66.0±19.1                          | 82.5±33.3                       | 0.065        |
| <b>Potássio</b>           | 4.4±0.6                            | 4.27±0.3                        | 0.085        |
| <b>Sódio</b>              | 140.5±3.2                          | 129.6±36.8                      | <b>0.041</b> |
| <b>Bilirrubina Total</b>  | 0.56±0.28                          | 0.75±0.54                       | <b>0.023</b> |
| <b>Bilirrubina Direta</b> | 0.19±0.1                           | 0.27±0.17                       | <b>0.023</b> |
| <b>Proteínas totais</b>   | 7.1±0.3                            | 7.4±0.9                         | 0.062        |
| <b>Colesterol total</b>   | 128.1±73.2                         | 158.0±100.5                     | 0.085        |
| <b>Colesterol LDL</b>     | 118.8±25.5                         | 119.2±49.6                      | <b>0.026</b> |
| <b>Colesterol HDL</b>     | 53.4±14.2                          | 45.0±14.0                       | 0.154        |
| <b>RMHb</b>               | 13.1±4.4                           | 12.4±4.7                        | 0.605        |
| <b>FA</b>                 | 173.7±65.2                         | 179.0±53.9                      | 0.725        |
| <b>RTM</b>                | 2.2±1.3                            | 1.9±0.9                         | 0.369        |
| <b>Atividade ECA</b>      | 10.9±6.8                           | 25.7±14.1                       | <b>0.015</b> |

Valores apresentados referem-se a médias±DP para as variáveis contínuas, e frequências absolutas (frequências relativas, %) para as variáveis qualitativas; %; Idade de diagnostico foi categorizado aparecimento depois dos 40 anos idade (≤ 40) e aparecimento antes dos 40 anos idade (> 40); PASI, Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase caracterizado em ligeira (PASI<10) e moderada ou grave (PASI≥10); VGM, volume globular médio (fL); Fosfatase alcalina (U/l); Potássio (mmol/l); Sódio (mmol/l); Bilirrubina Total (mg/dl); Bilirrubina Direta (mg/dl); Proteínas totais (g/dl); Colesterol total (mg/dl); LDL, *Low Density Lipoprotein* (mg/dl); HDL, *High Density Lipoprotein* (mg/dl); RMHb, redutase de metahemoglobina (μmol/gHb/min); FA, fosfatase ácida (μmol/gHb/h); RTM, redutase transmembranar (mmol ferr./L célula/hora); ECA, Enzima Conversor de Angiotensina (U/l); P, teste de qui quadrado; Valores significativos para *p* < 0.05.

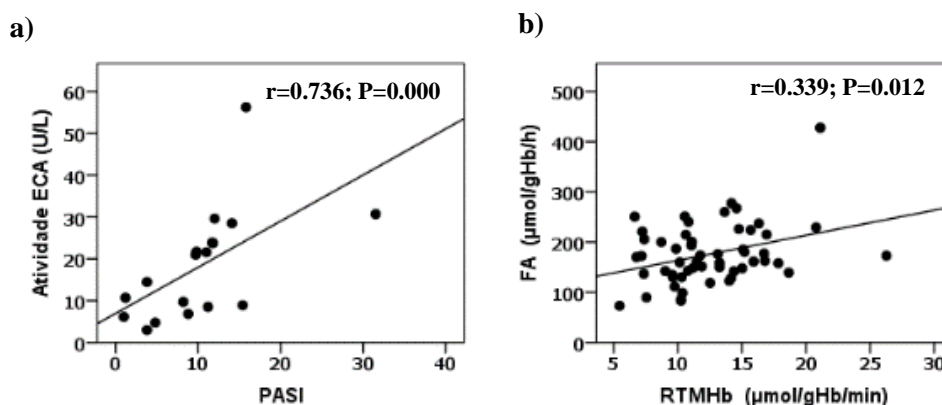
### 4.2. FENÓTIPOS INTERMÉDIO NA PSORÍASE

Foram analisadas as interações de alguns parâmetros resultantes da classificação da patologia, de meios complementar de diagnóstico (análise bioquímicas e atividades enzimáticas) nos indivíduos com psoríase. De acordo com os resultados expostos anteriormente, procedeu-se às correlações, de modo avaliar o grau de a associação entre estes parâmetros.

No geral para os parâmetros estudados nos indivíduos com psoríase, realizou-se correlação de Pearson ou de Spearman, de acordo com a normalidade (paramétricos e não paramétricos).

Considerando o PASI, e as atividades bioquímicas das enzimas, ECA, RTM, FA, RTMHb, tendo-se verificado correlações diretas para a atividade da ECA com o PASI ( $r=0.736$ ,  $P= 0.000$ ), assim como para a variação da FA com a RTMHb ( $r=0.339$ ,  $P= 0.012$ ), como esta representado na figura 4.1.

Quando se considerou as análises correntes, também se verificaram algumas correlações quer no que se refere a gravidade da doença, atividades enzimáticas ou entre os vários parâmetros bioquímicos.



**Figura 4.1.** Representação gráfica da variação da atividade da ECA com PASI (a) e variação da FA com a RTMHb em pacientes com psoríase. Correlação de Spearman em (a) e Pearson em (b); Valores significativos para  $p < 0.05$

Deste modo verificou-se que o PASI está inversamente relacionado com a concentração de colesterol HDL (mg/dl) ( $r= -0.469$ ;  $p= 0.006$ ) mas diretamente associada a razão colesterol total/HDL ( $r=0.385$ ;  $p= 0.027$ ), tabela 4.3.

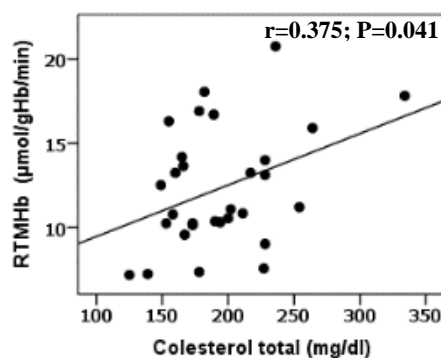
**Tabela 4.3.**Correlação da variedade do índice de gravidade (PASI) com parâmetros do perfil lipídico.

|      | Colesterol Total/HDL<br>(N=33) | Colesterol HDL<br>(N=33)     |
|------|--------------------------------|------------------------------|
| PASI | $r=0.385$<br><b>P=0.027</b>    | $r=-0.469$<br><b>P=0.006</b> |

Valores apresentados referem-se à correlação de Spearman; PASI, Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase; Colesterol HDL (mg/dl). Correlação de Spearman; Valores significativos para  $p < 0.05$

No que refere as atividades enzimáticas do eritrócito, nomeadamente a RTMHb, observou-se só correlação com um dos parâmetros do perfil lipídico, colesterol total (mg/dl), apresentando uma correlação direta ( $r=0.375$ ;  $P=0.041$ ), figura 4.2. No entanto verificou-se também uma ligeira tendência para a variação desta atividade com as concentrações séricas de potássio (mmol/l) e da glucose (mg/dl), ( $r=0.326$ ;  $P=0.091$ ,  $r=0.278$ ;  $P=0.078$ , respetivamente).

## RESULTADOS



**Figura 4.2.** Representação gráfica da variação da RTMHb com o colesterol total. Correlação de Pearson.

Quanto á atividade da RTM (redutase transmembranar) do eritrócito, está inversamente relacionada com parâmetros do hemograma e bioquímicos, das análises correntes. Para os parâmetros do hemograma, está inversamente relacionada com VGM (volume globular médio em fL), e HGM (hemoglobina globular média em pg), ( $r=-0.291$ ;  $P=0.040$ ,  $r=-0.347$ ;  $P=0.014$ , respetivamente), tabela 4.4, apresentando uma ligeira tendência negativa para a percentagem de monócitos ( $r=-0.239$ ;  $P=0.095$ ), dados não apresentados. No que diz respeito aos parâmetros bioquímicos séricos, há uma tendência de correlação inversa para a enzima Gama Glutamil Transferase (gama-GT) (U/l), ( $r=-0.261$ ;  $P=0.084$ ), e uma correlação direta para o colesterol total (mg/dl), ( $r=0.358$ ;  $P=0.038$ ), tabela 4.4.

**Tabela 4.4.** Correlação da atividade da RTM com parâmetros laboratoriais do hemograma e perfil lipídico.

|                            | VGM<br>(N=50)  | HGM<br>(N=50)  | Colesterol Total<br>(N=34) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| <b>RTM</b>                 | $r=-0.291$     | $r=-0.347$     | $r=0.358$                  |
| (mmol ferr./L célula/hora) | <b>P=0.040</b> | <b>P=0.014</b> | <b>P=0.038</b>             |

Valores apresentados referem-se à correlação de Spearman; RTM, redutase transmembranar (mmol ferr./L célula/hora); VGM, volume globular médio (fL); HGM, hemoglobina globular média (pg); Colesterol Total (mg/dl). Correlação de Spearman; Valores significativos para  $p < 0.05$

No que respeita á atividade da FA (fosfatase ácida do eritrócito ou LMWPTP), esta a semelhança da RTM, está inversamente relacionada com os parâmetros do hemograma e bioquímicos, das análises correntes. Relativamente aos parâmetros do hemograma, está inversamente correlacionada com o número de eritrócitos ( $\times 10^{12}/l$ ),  $r=-0.411$ ;  $P=0.006$ , assim como com a concentração de hemoglobina (g/dl) e com o hematócrito, ( $r=-0.458$ ;  $P=0.002$ ,  $r=-0.450$ ;  $P=0.002$ , respetivamente), mas diretamente associada a velocidade de sedimentação (mm),  $r=0.351$ ;  $P=0.028$ , tabela 4.5. Relativamente aos parâmetros bioquímicos séricos, no que respeita á concentração de sódio (mmol/l) e á osmolalidade (mOsmol/Kg), verificou-se que estes apresentaram uma correlação inversa, ( $r=-0.435$ ;  $P=0.018$ ,  $r=-0.493$ ;  $P=0.017$ , respetivamente), tabela 4.5.

**Tabela 4.5.** Corelação da atividade da FA com parâmetros laboratoriais do hemograma e séricos.

|  | <b>Eritrócitos</b><br>(N=44) | <b>Hemoglobina</b><br>(N=44)  | <b>Hematócrito</b><br>(N=44)  | <b>Velocidade<br/>sedimentação</b><br>(N=39) | <b>Sódio</b><br>(N=29)       | <b>Osmolalidade</b><br>(N=23) |
|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|-------------------------------|
| <b>FA</b><br>( $\mu\text{mol/gHb/h}$ ) | $r=-0.411$<br><b>P=0.006</b> | $r=-0.458$<br><b>P=0.0020</b> | $r=-0.450$<br><b>P=0.0020</b> | $r=0.351$<br><b>P=0.028</b>                  | $r=-0.435$<br><b>P=0.018</b> | $r=-0.493$<br><b>P=0.017</b>  |

Valores apresentados referem-se à correlação de Spearman; FA, fosfatase ácida ( $\mu\text{mol/gHb/h}$ ); eritrócitos ( $\times 10^{12}/\text{l}$ ); hemoglobina (g/dl); hematócrito (%); velocidade de sedimentação (mm); sódio (mmol/l); osmolalidade (mOsmol/Kg). Corelação de Pearson, Valores significativos para  $p < 0.05$

Quando correlacionados entre si os parâmetros analíticos clínicos, verificou-se que a concentração de sódio, a bilirrubina total e direta, estavam correlacionados com alguns parâmetros do hemograma e séricos. Assim, a concentração de sódio demonstrou estar diretamente relacionada com VGM e HGM, ( $r=-0.348$ ;  $P=0.044$ ,  $r=-0.429$ ;  $P=0.011$ , respectivamente), apresentando uma tendência para a percentagem de monócitos ( $r=-0.325$ ;  $P=0.061$ ), tabela 4.6. Do mesmo modo estão também diretamente correlacionados com a concentração de creatinina (mg/dl) ( $r=0.325$ ;  $P=0.036$ ), os cloretos (mmol/l) ( $r=0.472$ ;  $P=0.007$ ), bem como com a osmolalidade (mOsmol/Kg) ( $r=0.835$ ;  $P=0.000$ ), tabela 4.6.

**Tabela 4.6.** Corelação do sódio com parâmetros laboratoriais do hemograma e séricos.

|              | <b>VGM</b><br>(N=34)        | <b>HGM</b><br>(N=34)        | <b>Monócitos</b><br>(N=34) | <b>Creatinina</b><br>(N=33) | <b>Cloretos</b><br>(N=31)     | <b>Osmolalidade</b><br>(N=26) |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>Sódio</b> | $r=0.348$<br><b>P=0.044</b> | $r=0.429$<br><b>P=0.011</b> | $r=-0.325$<br>$P=0.061$    | $r=0.367$<br><b>P=0.036</b> | $r=-0.472$<br><b>P=0.0007</b> | $r=-0.835$<br><b>P=0.000</b>  |

Valores apresentados referem-se à correlação de Spearman; sódio (mmol/l) VGM, volume globular médio (fL); HGM, hemoglobina globular média (pg); monócitos (%); creatinina (mg/dl); cloretos (mmol/l); osmolalidade (mOsmol/Kg). Corelação de Spearman; Valores significativos para  $p < 0.05$

No que diz respeito a bilirrubina total (mg/dl) e direta (mg/dl), verificou-se que se correlacionam diretamente com o número de eritrócitos ( $\times 10^{12}/\text{l}$ ), ( $r=0.506$ ;  $P=0.004$ ,  $r=0.455$ ;  $P=0.022$ , respectivamente), concentração de hemoglobina (g/dl) ( $r=0.569$ ;  $P=0.001$ ,  $r=0.478$ ;  $P=0.016$ , respectivamente) e percentagem de hematócrito ( $r=0.606$ ;  $P=0.000$ ,  $r=0.516$ ;  $P=0.008$ , respectivamente), tabela 4.7. Porém estão inversamente relacionados com a velocidade de sedimentação (mm), ( $r=-0.436$ ;  $P=0.023$ ,  $r=0.552$ ;  $P=0.006$ , respectivamente), como se verifica na tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Corelação da bilirrubina total e direta com parâmetros laboratoriais do hemograma.

|                           | <b>Eritrócitos</b><br>(N=31) | <b>Hemoglobina</b><br>(N=34) | <b>Hematócrito</b><br>(N=34) | <b>Velocidade<br/>sedimentação</b><br>(N=33) |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|
| <b>Bilirrubina total</b>  | $r=0.506$<br><b>P=0.004</b>  | $r=-0.569$<br><b>P=0.001</b> | $r=-0.606$<br><b>P=0.000</b> | $r=-0.436$<br><b>P=0.023</b>                 |
| <b>Bilirrubina direta</b> | $r=0.455$<br><b>P=0.022</b>  | $r=-0.478$<br><b>P=0.016</b> | $r=-0.516$<br><b>P=0.008</b> | $r=-0.552$<br><b>P=0.006</b>                 |

Valores apresentados referem-se à correlação de Spearman; bilirrubina total (mg/dl) e bilirrubina direta (mg/dl) eritrócitos ( $\times 10^{12}/\text{l}$ ); hemoglobina (g/dl); hematócrito (%); velocidade de sedimentação (mm). Corelação de Spearman; Valores significativos para  $p < 0.05$

## RESULTADOS

### 4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES CASO-CONTROLO

A tabela 4.3 apresenta as características demográficas e bioquímicas da amostra estudada no âmbito deste estudo retrospectivo e de associação caso-controlo. Neste sentido foi selecionado um grupo controlo (N=358), sem psoríase, do qual posteriormente foi selecionado um subgrupo com hipertensão (HTA) (N=82), subgrupo de risco cardiovascular.

No que refere aos dados demográficos, idade e sexo, a população psoriásica, como referido anteriormente, apresenta uma média de idades de 52 anos, sendo na sua maioria (69.8%) homens, não se verificando diferenças significativas ( $P>0.05$ ), entre os grupos controlo e psoríase. Por sua vez, quando considerado o subgrupo com HTA, este apresenta idades mais elevadas, em média 61 anos, e maioritariamente mulheres, observando-se diferenças significativas ( $P<0.05$ ) para este subgrupo e o grupo psoriático.

Quanto aos parâmetros enzimáticos ou bioquímicos, RMHb, FA e RTM, apresentaram valores mais baixos para a população psoriásica. Esta diferença no decréscimo das atividades, foi estatisticamente significativa, ( $P<0.05$ ), quer quando considerado os grupos, controlo *versus* psoríase, quer HTA *versus* psoríase.

Relativamente á atividade ECA, na população psoriásica foi determinada para 20 doentes com psoríase, tendo estes apresentado, em média atividades mais elevadas ( $19.1\pm12.8$ ), tanto em relação aos controlos como ao subgrupo com hipertensão. Para a comparação controlo (N=90) *versus* psoríase (N=20), a população controlo apresenta em média de atividade de ( $12.6\pm6.0$ ), significativamente diferente  $P=0.048$ , do mesmo modo quando comparando psoríase *versus* HTA, a população hipertensa apresenta em média de atividade de ( $13.7\pm7.02$ ), significativamente diferente  $P=0.044$ , tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Características selecionadas da amostra estudada

|                      | Controlos<br>N=358 | Psoríase<br>N=63 | HTA-subgrupo<br>N=82 | P <sup>a</sup> | P <sup>b</sup> |
|----------------------|--------------------|------------------|----------------------|----------------|----------------|
| <b>Sexo</b>          |                    |                  |                      |                |                |
| Feminino             | 122 (34.1%)        | 19 (30.2%)       | 49 (59.8%)           | 0.543          | <b>0.000</b>   |
| Masculino            | 236 (65.9%)        | 44 (69.8%)       | 33 (40.2%)           |                |                |
| <b>Idade</b>         | 49.73±13.6         | 52.21±12.9       | 61.09±9.39           | 0.181          | <b>0.003</b>   |
| <b>RMHb</b>          | 21.6±7.0           | 12.9±4.5         | 22.90±9.13           | <b>0.000</b>   | <b>0.000</b>   |
| <b>FA</b>            | 272.7±96.1         | 176.0±60.4       | 255.04±96.99         | <b>0.000</b>   | <b>0.000</b>   |
| <b>RTM</b>           | 5.2±2.0            | 2.1±1.1          | 4.60±1.62            | <b>0.000</b>   | <b>0.000</b>   |
| <b>Atividade ECA</b> | 12.6±6.0           | 19.1±12.8        | 13.7±7.2             | <b>0.048</b>   | <b>0.048</b>   |

Valores apresentados referem-se a médias±DP para as variáveis contínuas, e frequências absolutas (frequências relativas, %) para as variáveis qualitativas; *RMHb*, redutase de metahemoglobina; *FA*, fosfatase ácida; *RTM*, redutase transmembranar; *ECA*, Enzima Conversor de Angiotensina; HTA, Hipertensão; P<sup>a</sup>, controlo *versus* psoríase; P<sup>b</sup>, HTA *versus* psoríase; P, t-teste; Valores significativos para  $p < 0.05$ .

### 4.3. GENES MODIFICADORES NA PSORÍASE

Na tabela 4.9, apresentam-se as frequências dos genótipos e respetivos alelos dos polimorfismos funcionais estudados, comparando os três grupos, controlos, sem psoríase, doentes psoriásicos e HTA, não se verificando diferenças significativas,  $P<0.05$ , entre as diferentes populações, para nenhum dos polimorfismos em estudo. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos são consistentes com distribuição prevista pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW).

**Tabela 4.9.** Distribuição dos genótipos da *ECA*, *eNOS*, *MPO*, *DHFR*, *MTHFR*, *COMT*, em controles, doentes psoriásicos e HTA-subgrupo

|                       | Controlos      | Psoríase      | HTA-subgrupo  | P <sup>a</sup> | P <sup>b</sup> |
|-----------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| <b><i>ECA</i></b>     | <i>N</i> = 334 | <i>N</i> = 61 | <i>N</i> = 76 |                |                |
| <b><i>II</i></b>      | 35 (10.5)      | 7 (10.4)      | 8 (10.5)      |                |                |
| <b><i>ID</i></b>      | 158 (47.3)     | 31 (46.3)     | 39 (51.3)     | 0.659          | 0.471          |
| <b><i>DD</i></b>      | 141 (42.2)     | 29 (43.3)     | 29 (38.2)     |                |                |
| <b>Alelo I</b>        | 440 (65.9)     | 45 (33.6)     | 97 (63.8)     |                |                |
| <b>Alelo D</b>        | 228 (34.1)     | 89 (66.4)     | 55 (36.2)     | 0.982          | 0.737          |
| <b>HW</b>             | P=0.787        | P=0.955       | P=0.777       |                |                |
| <b><i>NOS3</i></b>    | <i>N</i> = 240 | <i>N</i> = 57 | <i>N</i> = 49 |                |                |
| <b><i>bb</i></b>      | 174 (72.5)     | 42 (24.6)     | 33 (67.3)     |                |                |
| <b><i>ab</i></b>      | 54 (22.5)      | 14 (24.6)     | 14 (28.6)     | 0.548          | 0.666          |
| <b><i>aa</i></b>      | 12 (5.0)       | 1 (1.8)       | 2 (4.1)       |                |                |
| <b>Alelo b</b>        | 402 (83.8)     | 98 (86.0)     | 80 (81.6)     |                |                |
| <b>Alelo a</b>        | 78 (16.3)      | 16 (14.0)     | 18 (18.4)     | 0.660          | 0.503          |
| <b>HW</b>             | P=0.210        | P=1.000       | 0.988         |                |                |
| <b><i>MPO</i></b>     | <i>N</i> = 291 | <i>N</i> = 58 | <i>N</i> = 38 |                |                |
| <b><i>GG</i></b>      | 141 (48.5)     | 24 (41.4)     | 16 (42.1)     |                |                |
| <b><i>GA</i></b>      | 116 (39.9)     | 26 (44.8)     | 14 (36.8)     | 0.611          | 0.583          |
| <b><i>AA</i></b>      | 34 (11.7)      | 8 (13.8)      | 8 (21.1)      |                |                |
| <b>Alelo G</b>        | 398 (68.4)     | 74 (63.8)     | 46 (60.5)     |                |                |
| <b>Alelo A</b>        | 184 (31.6)     | 42 (36.2)     | 30 (39.5)     | 0.392          | 0.760          |
| <b>HW</b>             | P=0.638        | P=0.995       | P=0.632       |                |                |
| <b><i>DHFR</i></b>    | <i>N</i> = 132 | <i>N</i> = 60 | <i>N</i> = 48 |                |                |
| <b><i>ins/ins</i></b> | 40 (30.3)      | 16 (26.7)     | 9 (18.8)      |                |                |
| <b><i>ins/del</i></b> | 68 (51.5)      | 29 (48.3)     | 18 (58.3)     | 0.545          | 0.529          |
| <b><i>del/del</i></b> | 24 (12.5)      | 15 (25.0)     | 11 (22.9)     |                |                |
| <b>Alelo ins</b>      | 148 (56.1)     | 61 (50.8)     | 36 (47.4)     |                |                |
| <b>Alelo del</b>      | 116 (43.9)     | 59 (49.2)     | 40 (52.6)     | 0.399          | 0.744          |
| <b>HW</b>             | P=0.953        | P=0.996       | 0.993         |                |                |
| <b><i>MTHFR</i></b>   | <i>N</i> = 136 | <i>N</i> = 71 | <i>N</i> = 58 |                |                |
| <b><i>CC</i></b>      | 56 (41.2)      | 22 (38.6)     | 23 (39.7)     |                |                |
| <b><i>CT</i></b>      | 65 (47.8)      | 28 (49.1)     | 26 (44.8)     | 0.934          | 0.845          |
| <b><i>TT</i></b>      | 15 (11.0)      | 7 (12.3)      | 9 (15.5)      |                |                |
| <b>Alelo C</b>        | 177(65.1)      | 72 (63.8)     | 72 (62.1)     |                |                |
| <b>Alelo T</b>        | 95 (34.9)      | 42 (36.8)     | 44 (37.9)     | 0.809          | 0.973          |
| <b>HW</b>             | P=0.893        | P=0.952       | P=0.955       |                |                |
| <b><i>COMT</i></b>    | <i>N</i> = 62  | <i>N</i> = 56 | <i>N</i> = 33 |                |                |
| <b><i>GG</i></b>      | 20 (32.3)      | 18 (32.1)     | 11(33.3)      |                |                |
| <b><i>GA</i></b>      | 32 (51.6)      | 31 (55.4)     | 16(48.5)      | 0.841          | 0.721          |
| <b><i>AA</i></b>      | 10 (16.1)      | 7 (12.5)      | 6(18.2)       |                |                |
| <b>Alelo G</b>        | 72 (58.1)      | 67 (59.8)     | 38 (57.6)     |                |                |
| <b>Alelo A</b>        | 52 (41.9)      | 45 (40.2)     | 28 (42.4)     | 0.888          | 0.891          |
| <b>HW</b>             | P=0.934        | P=0.729       | P=1.000       |                |                |

Os valores para os genótipos e respetivos alelos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *ECA*, Enzima Conversor de Angiotensina; *eNOS*, sintase do óxido nítrico endotelial; *MPO*, mieloperoxidase; *DHFR*, dihidrofolato redutase; *MTHFR*, metilenotetrahidrofolato redutase; *COMT*, catecol-O-metiltransferase; HTA, Hipertensão; HW, equilíbrio de Hardy-Weinberg; P<sup>a</sup>, controlo *versus* psoríase; P<sup>b</sup>, HTA *versus* psoríase; P, teste de qui quadrado; Valores significativos para  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 4.4. RELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

De acordo com a análise do papel dos genes modificadores e de alguns parâmetros clínicos e bioquímicos, descritos anteriormente, com vista a perceber o desenvolvimento e progressão da psoríase e das respetivas comorbilidades cardiovasculares, foi analisada a relação do perfil genético com os fenótipos intermédios e mais distantes.

#### 4.4.1. PSORÍASE

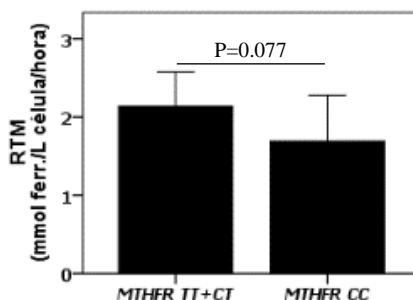
No que concerne a idade de diagnóstico e comparando com os genótipos verificou-se uma tendência nos indivíduos portadores da sequência *Alu*, da *ECA* para o desenvolvimento/diagnóstico da psoríase numa idade mais precoce, antes dos 40 anos, quando comparados com indivíduos portadores do alelo sem a sequência *Alu* (ID+DD). Relativamente a *MPO* verificou-se indivíduos portadores do alelo mais frequente aparenta estar associados a um desenvolvimento/diagnóstico mais precoce, antes dos 40 anos, do que os indivíduos homozigóticos para o alelo menos frequente (AA),  $P=0.021$  quando considerado os diferentes genótipos, e  $P=0.012$  para o modelo *MPO* GA+GG.

**Tabela 4.10.** Distribuição dos genótipos da *MPO* e *ECA* em indivíduos com psoríase, de acordo com a idade de diagnóstico:

|                   | MPO      |          |           |       |          |            |       |
|-------------------|----------|----------|-----------|-------|----------|------------|-------|
| Idade diagnóstico | GG       | GA       | AA        | P     | AA       | GA+GG      | P     |
| ≤40               | 7 (28.0) | 17(68.0) | 1 (4.0)   | 0.021 | 1 (4.0)  | 24 (96.0)  | 0.012 |
| >40               | 3 (37.5) | 2 (25.0) | 3(37.5)   |       | 3 (37.5) | 5 (62.5)   |       |
|                   | ECA      |          |           |       |          |            |       |
| Idade diagnóstico | II       | ID       | DD        | P     | II       | ID+DD      | P     |
| ≤40               | 6 (24.0) | 9(36.0)  | 10 (40.0) | 0.190 | 6 (24.0) | 24 (76.0)  | 0.075 |
| >40               | 0 (0)    | 6 (54.5) | 5 (45.5)  |       | 0 (0.0)  | 11 (100.0) |       |

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *MPO*, mieloperoxidase; *ECA*, Enzima Conversor de Angiotensina; Idade de diagnóstico foi categorizado aparecimento depois dos 40 anos idade (≤ 40) e aparecimento antes dos 40 anos idade; P, teste de qui quadrado; Valores significativos para  $p < 0.05$ .

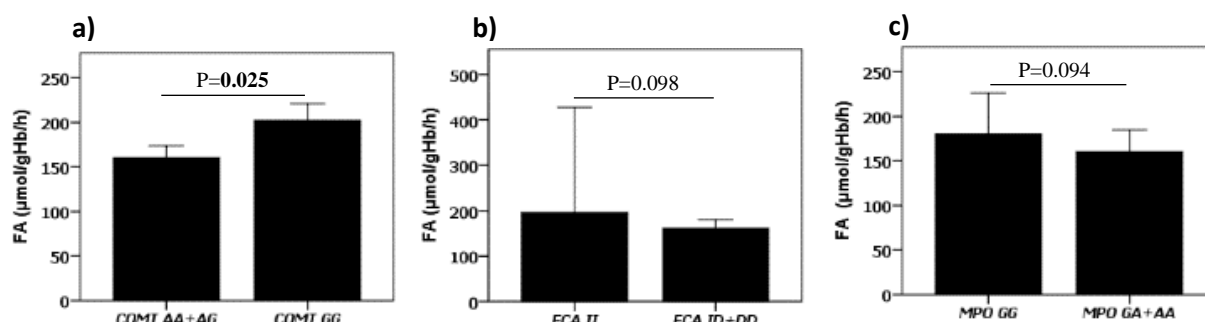
Quando se considerou a interação genótipo-fenótipo, para a *MTHFR* e RTM, verificou-se os indivíduos portadores do alelo menos frequente (TT+CT) da *MTHFR*, em média apresentam uma tendência ( $P=0.077$ ), de atividade da RTM mais elevadas ( $2.31 \pm 1.27$ ), quando comparados com indivíduos sem mutação, *MTHFR* CC,  $1.73 \pm 0.88$ , figura 4.3.



**Figura 4.3.** Representação gráfica da distribuição do genótipo da *MTHFR*, segundo o modelo TT+CT vs CC em relação a RTM

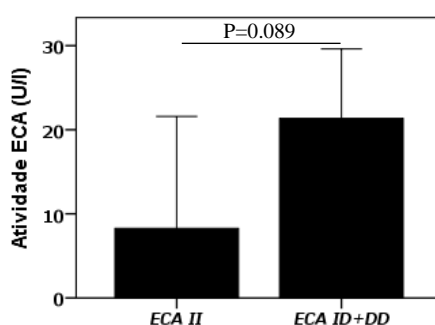


Considerando a interação genótipo-fenótipo, para a atividade FA e os vários polimorfismos, verificou-se que portadores do alelo menos frequente (AA+GA) da *COMT* apresenta significativamente ( $P=0.025$ ) atividades mais baixas daqueles que são portadores do alelo mais frequente, *COMT* AA+GA ( $164.2\pm51.0$ ) versus *COMT* GG ( $202.8\pm70.4$ ), figura 4.4 (a). Observou-se também ligeiras tendências para o os genótipos da ECA e MPO ( $P=0.098$  e  $P=0.094$ , respectivamente), figura 4.4 (b e c). Relativamente a interação para a ECA os indivíduos homozigóticos para o alelo de inserção da sequencia *Alu*, verificou-se um ligeiro aumento da atividade da FA ( $209.0\pm100.5$ ), quando comparados com indivíduos portadores do alelo deleção ( $171.0\pm49.7$ ). Do mesmo modo, para a MPO verificou-se que os psoriásicos portadores do alelo menos frequente (GA+AA) apresentam atividades ligeiramente mais baixas ( $165.1\pm46.5$ ) em relação aos psoriásicos homozigóticos para o alelo mais frequente. ( $192.5\pm72.9$ ).



**Figura 4.4.** Representação gráfica da distribuição do genótipo da *COMT*, *ECA* e *MPO* em relação a atividade da FA.

No que concerne a atividade da ECA, verificou-se uma ligeira tendência ( $P=0.089$ ) para um aumento da atividade em indivíduos portadores do alelo deleção para a sequencia *Alu*, ( $21.3\pm13.0$ ) em comparação com indivíduos homozigóticos para o alelo inserção ( $10.3\pm8.0$ ), como se apresenta na figura 4.5.



**Figura 4.5.** Representação gráfica da distribuição do genótipo da *ECA* em relação a atividade da ECA.

### 4.4.2. CASO-CONTROLO

Na sequencia da analise da relação do perfil genético com os fenótipos intermédios e mais distantes, procedeu-se a analise interação genótipo-fenótipo para as três populações em estudo.

Procedeu-se a seleção de cada genótipo e/ou modelo e comparou-se a variação das atividades bioquímicas, RTM, RTMHb, FA, e ECA, para as populações em estudo, psoriásica, controlos e subgrupo HTA, tendo-se verificado o mesmo perfil de variação. Isto é, a população psoriásica apresenta sempre menores atividades para a RTM, RTMHb e FA, em relação ao controlo e ao subgrupo HTA, independente do polimorfismo e/ou genótipo em estudo. Atividade da ECA está mais aumentadas na população psoriásica a semelhança do apresentado na tabela 4.8, verificando-se este aumento independente do polimorfismo e/ou genótipo, a semelhança das restantes atividades.

## **DISCUSSÃO**



## 5. DISCUSSÃO

A Psoríase é uma doença crônica que se caracteriza por hiperproliferação dos queratinócitos, imunomediada, especialmente por linfócitos Th1 e Th17, esta disfunção produz uma inflamação sistêmica que consequentemente leva a uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. A produção excessiva resulta no recrutamento de outras células do sistema imune e na expressão do fator de crescimento do endotélio vascular(VEGF), promovendo assim a proliferação vascular.<sup>26,116</sup>

O padrão de hereditariedade não está totalmente esclarecido, no entanto sabe-se que a predisposição genética e sua relação com o ambiente têm um papel importante no desenvolvimento da psoríase. Embora, o PSORS1 esteja identificado como o maior determinante genético da psoríase, muitos outros genes e respectivos polimorfismos têm sido estudados para que a patogênese da psoríase seja melhor compreendida e assim possibilite o desenvolvimento de novas terapêuticas individualizadas.

Os polimorfismos aqui estudados foram selecionados tendo em conta o processo inflamatório compartilhados pela psoríase e doença cardiovascular, nomeadamente com a via da homocisteína e do stresse oxidante.

Em todos os polimorfismos não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0.005$ ) entre os psoriásicos e a população controle, sem a patologia, assim como para o subgrupo de hipertensos sem a patologia. Estes resultados indica-nos que, embora a predisposição genética exerce um papel importante nesta patologia, poderá não ser o que baste para a desenvolvimento da psoríase.

No que concerne, a avaliação clínica da população psoriásica, nomeadamente a morfologia, gravidade e idade de aparecimento, esta descrito que a forma morfológica mais comum, com cerca de 80-90% dos doentes é a psoríase em placas, da qual a idade de diagnóstico esta relacionada com fatores hereditários, em que antes dos 40 anos de idade, apresenta uma maior incidência familiar e uma maior tendência para se tornar generalizada.<sup>6</sup> No entanto quanto a gravidade toma em conta o eritema, a espessura e grau de descamação das lesões, bem como a área da superfície corporal envolvida, estando em alguns estudos classificada com ligeira para PASI  $< 10$ , e moderada a grave para PASI  $\geq 10$ .<sup>14,117</sup>

Neste contexto a população por nós manifesta uma incidência de 93.5% da psoríase em placas, forma morfológica mais comum, e 61.3% dos casos têm um índice de gravidade moderado a grave, PASI  $\geq 10$ . Quanto á idade de diagnóstico, os nossos doentes apresentam uma idade precoce, antes dos quarenta anos de idade, o que poderá estar relacionada com fatores hereditários, não nos sendo permitida fazer esse tipo de análises uma vez que não temos informação clínica para a história familiar.

A artrite psoriática, uma das comorbilidades mais antigas associada a psoríase, manifesta-se preferencialmente entre os 30 e 55 anos, e está presente em 5% dos indivíduos com psoríase gutata e 15% com psoríase em placa.<sup>31</sup> Deste modo, percentagem elevada (42.9%) de doentes com artrite psoriática por nos encontra esta de acordo como a literatura, uma que a média de idade é de 52 anos, e que 95.1% dos casos apresenta psoríase em placas ou gutata.

O PASI poderá estar aumentado na nossa população, uma vez que está foi recrutada no serviço de dermatologia do hospital de Santa Maria e em alguns dos casos no internamento, sendo um serviço de referencia com formas mais graves, provavelmente numa fase de exacerbação, já que esta patologia se caracteriza por períodos de exacerbação e remissão, sendo a ida ao hospital mais frequente na fase de exacerbação.<sup>7</sup> Contudo sabe-se que a gravidade da doença esta relacionada com o aparecimento precoce,

o que se verifica na nossa amostra, como referido anteriormente, podendo ser um indicador de um PASI elevada, apesar de neste estudo não se ter verificado associação entre o PASI e a idade de diagnóstico.<sup>2</sup>

No entanto, comparando o PASI com parâmetros analíticos correntes de rotina, desta patologia, verificamos algumas diferenças significativas, como é o caso da bilirrubina total e direta, que embora apresentem valores considerados normais, estes são mais elevados em doentes com psoríase moderada a graves. A bilirrubina total nos pacientes com  $\text{PASI} \geq 10$  apresentam valores de  $0.75 \pm 0.54$  mg/dl, e para bilirrubina direta  $0.27 \pm 0.17$  mg/dl, estando esta ultima no limiar do considerado normal ( $< 0.3$ ), o que não se verifica para a bilirrubina total ( $< 1.0$ ). Sabe-se que em adultos, níveis elevados de bilirrubina podem ser causados por patologia hepática, nos ductos biliares e/ou na vesícula biliar, porém outra causa da elevação dos níveis da bilirrubina é a destruição mais precoce das células de eritrócitos, uma vez que está é produzida pelo organismo quando os eritrócitos mais idosos são destruídos no baço. Dado que a psoríase apresenta alterações a nível dos eritrócitos que terão um dano reforçada e/ou processo de envelhecimento, o que parecem estar fortemente ligado ao stress oxidante e agravamento da psoríase, podendo contribuir para níveis mais elevados de bilirrubina.<sup>118</sup>

A bilirrubina total e direta apresentaram correlações com alguns parâmetros do eritrócito (tabela 4.7), verificando-se uma correlação direta com o número de eritrócitos, sendo que quanto mais elevado o número de eritrócitos mais destruição, mais bilirrubina formada. Por outro lado, a correlação inversa com o hematócrito, a hemoglobina e velocidade de sedimentação, com a bilirrubina total e direta, indica nos uma maior destruição dos eritrócitos, e consequentemente a diminuição destes parâmetros eritrocitários. Os nossos dados são semelhantes ao do estudo de Rocha-Pereira et al em 2004, que em busca de modificações oxidantes resultantes do stress oxidante desenvolvido no eritrócito, a avaliação da hemoglobina ligada à membrana, indicou a oxidação de Hb que mostrou um forte aumento em pacientes com psoríase.<sup>118</sup>

É conhecido que os doentes psoriásicos têm concentrações plasmáticas mais elevadas de triglicerídeos, colesterol total, VLDL, LDL e lipoproteína A e igualmente concentrações séricas baixas de HDL e apolipoproteína B.<sup>7</sup> Interessante também é a demonstração que este perfil dislipidémico se encontra presente desde o início da doença cutânea, inferior a 1 ano.<sup>1</sup> Os dados por nós apresentados, estão de acordo com outros e desmontaram um aumento do colesterol LDL em doentes com psoríase moderada a grave em relação a psoríase ligeira, assim como do colesterol total, que embora o aumento deste em relação a gravidade não seja significativo, apresentam uma tendência (tabela 4.2). Foi encontrado uma diminuição da concentração de HDL com a gravidade da patologia, estando inversamente correlacionadas, no entanto para a razão colesterol total/HDL apresenta uma correlação direta com o PASI, provavelmente a custa dos valores de colesterol total estarem aumentados com a gravidade da doença (tabela 4.3).

Relativamente a esta avaliação do perfil lipídico nos psoriático, observou-se que o colesterol total esta diretamente correlacionada com duas das atividades do eritrócito, RTMHb e RTM, figura 4.2 e tabela 4.4, respetivamente. Sabe-se que o transportador de membrana, banda 3, medeia as trocas de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , aumentando a capacidade sanguínea de transporte de  $\text{CO}_2$ , garantindo a homeostasia e o equilíbrio ácido-base. Por interação com lipídeos e proteínas, a banda 3 multifuncional une o complexo multiproteico do citoesqueleto e confere aos eritrócitos propriedades mecânicas e elásticas, regulando a viscosidade sanguínea.<sup>119</sup> Deste modo, alterações na fluidez da membrana podem refletir a dislipidémia, a atividades enzimáticas eritrocitárias diminuídas e a produção de ROS aumentada, levando ao aumento da peroxidação lipídica e á depleção das defesas antioxidantes. A psoríase tem sido associada com o

stresse oxidante, metabolismo lipídico anormal e uma elevada frequência de eventos cardiovasculares.<sup>118,120</sup>

O sódio existe armazenado nos seres humanos no tecido extracelular subcutâneo e muscular, e o aumento deste armazenamento em tecidos extra-renal tem sido descrito como estando associado a HTA, a doenças autoimunes e a defesa do organismo contra infecções. Foi demonstrado recentemente que a pele é um local importante para a regulação extra-renal do sódio no metabolismo, contudo os mecanismos de entrada na pele e a sua depuração a partir do tecido intersticial permanecem em grande parte desconhecidos. Há evidências que sugerem que a pele é um sistema vascular funcional em contra corrente semelhante ao rim.<sup>121</sup> Níveis aumentados de sódio, mediados por hipertonicidade aceleram a cascata de sinalização dependente da SGK1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase 1*) levando a um aumento da indução de células Th17 pró-inflamatórias.<sup>122</sup>

Neste contexto, os resultados obtidos sugerem que fatores ambientais como o sódio, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes como a psoríase, pela indução das células Th17. Apesar dos indivíduos com formas mais graves apresentarem concentrações de sódio no plasma sanguíneo mais baixas, porém como um desvio padrão mais elevado (tabela 4.2), as correlações inversas para a concentração de cloretos e a osmolalidade, indicam uma desregulação na homeostasia eletrolítica. A relação positiva com os parâmetros eritrocitários VGM e HGM poderá ser explicada com os mecanismos de contra-corrente, que permite a pele controlar o seu próprio microambiente, criando uma barreira biológica concebida para evitar a perda de fluido intersticial, como descrito no estudo de Hofmeister 2015.<sup>121</sup>

A barreira biológica criada pela pele, para controlar o seu próprio microambiente, essencial na adaptação a estímulos ambientais que é mediada em parte pela sua elasticidade vascular notável. Está descrito que alguns animais, tais como os anfíbios, respondem à hipoxia em parte através da pele, contudo há dúvidas de que possa influenciar a adaptação sistêmica de mamíferos a níveis baixos de oxigênio. Boutin et al em 2008, demonstraram a deleção epidérmica do HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia responsive transcription factor*) inibe a síntese renal de eritropoietina (EPO) em resposta a hipoxia, e que em ratos a pele é um mediador importante das respostas sistêmicas ao oxigênio ambiental, pela libertação do óxido nítrico induzido pela via do HIF que atua no fluxo vascular cutânea para aumentar a expressão de eritropoietina sistêmica.<sup>123</sup>

Neste contexto poderá ocorrer alguma hipoxia na pele psoriásica, provocada pelo excesso de proliferação das células, que levará a um aumento da atividade da ECA, ao nível do pulmão, uma vez que a maior parte da ECA circulante é derivado do endotélio pulmonar. Deste modo os níveis elevados da atividade da ECA, verificados poderão estar relacionadas com a existência de hipoxia relativa na pele psoriásica, daí que existam as diferenças significativas, bem como correlações diretas com a gravidade da doença (figura 4.1). Este aumento da atividade da ECA permanece significativo comparativamente à população controlo e do subgrupo HTA.

Sabe-se também que dos diferentes genótipos do polimorfismo ECA I/D, portadores do genótipo DD têm atividades da ECA superuma vez que verificamos uma ligeira tendência para um aumento da atividade em indivíduos portadores do alelo D. No entanto quando estudada a suscetibilidade para a doença, alguns estudos têm demonstrado a associação do alelo I para o aumento da suscetibilidade da patologia, porém nós verificamos uma prevalência do alelo D, mesmo quando comparado com a idade de diagnóstico.

No que concerne a idade de diagnóstico verificou-se, também, uma associação com o polimorfismo MPO G463A. Nos encontramos uma maior prevalência de indivíduos com genótipo GA em doentes com idade de diagnóstico mais precoce, assim como para o modelo GA+GG, tabela 4.10.

A MPO é uma enzima importante na regulação do stresse oxidante através da produção de HOCl e de outros ROS, que participam no stresse oxidante durante a resposta imune inata. Sabe-se que o alelo A, foi associado a uma diminuição da ligação SP1 e, portanto, uma menor atividade transcricional do gene e da produção de ROS, diminuindo a incidência de várias doenças.<sup>100,103</sup> Deste modo, a maior expressão dos genótipos GG+GA, encontrado nos doentes com idade de diagnóstico mais precoce, poderá contribuir para o despoletar mais precoce, uma vez que atividade da MPO produz ROS, derivados do NO, necessário em mecanismos celulares.

Os produtos oxidantes do MPO podem lesar células na vizinhança das células alvo, consumir NO endotelial causando vasoconstrição, produção de lípidos oxidados citotóxicos e causar lesões ao DNA, entre outras complicações.<sup>103</sup> Logo, maior atividade da MPO associada ao alelo G conduz a formação de maiores níveis oxidantes por parte do MPO que estão relacionados com o processo inflamatório devido a fenómenos de peroxidação lipídica e ao stresse oxidante.

O stresse oxidante pode provocar efeitos nefastos, contudo se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas uma célula, normalmente é capaz de superar esses efeitos, bastando para isso restabelecer o equilíbrio normal intracelular. Porém se as perturbações forem em grande escala podem provocar lesões massivas a nível celular associados à peroxidação lipídica e a modificações nas proteínas e ácidos nucleicos, desencadeando a apoptose celular

O eritrócito, devido a sua função de transporte de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> entonta-se exposto a fontes de ROS. Uma vez que não apresenta núcleo ou mitocôndrias, não pode voltar a sintetizar nenhuma enzima antioxidante, sendo a sua estabilidade e capacidade antioxidante assegurada através do transporte membranar de eletrões. Rocha\_Pereira et al 2004, estudaram o eritrócito como um potencial marcador de stresse oxidativo e proteolítica no tratamento da psoríase bem como no agravamento da doença, verificando uma redução do número de eritrócitos em doentes com psoríase, dano reforçada e/ou processo de envelhecimento, fortemente relacionada com o stresse oxidativo e agravamento do envelhecimento na psoríase, com referido anteriormente.<sup>118</sup>

Os resultados por nós encontrados para as atividades do eritrócito, RMHb, FA e RTM, apresentam diferenças significativas para as três atividades, em relação a população controlo, e subgrupo HTA, sugerindo alterações nos eritrócitos dos psoriásicos. Por outro lado, para a atividade enzimática da ECA, verificaram-se níveis mais elevados da atividade enzimática nos psoriasicos em relação a população controlo, assim com para os hipertensos, podendo ser justificada pela hipoxia, como referido anteriormente.

Relativamente a RTM, e RMHb, enzimas responsáveis pelo equilíbrio redox do eritrócito através do transporte de eletrões ao nível membranar e redução da metHb com a oxidação de NADH, verificou-se uma diminuição destas em relação as populações controlo e com HTA. A RTM, desempenha função importante na manutenção do equilíbrio redox no eritrócito, uma vez que é responsável pela remoção de eletrões intracelulares derivados de NADH, através da membrana. Deste modo, a diminuição da sua atividade resulta no aumento da sobrecarga oxidante na célula, o que indica uma maior sobrecarga oxidante em doentes psoriásicos. Por sua vez a RMHb, responsável pela redução da metHb a hemoglobina, com oxidação de NADH, encontra-se também diminuída, que poderá estar implicada na acumulação da metahemoglobina, devido a baixa afinidade para o oxigénio, que potencia o



desenvolvimento de fenômenos de hipoxia e de aumento de geração de ROS, como o anião superóxido. No eritrócito, a isoforma solúvel da RMHb catalisa a redução da metahemoglobina a desoxihemoglobina, reação que pode ser potenciada pela presença de oxidantes com as ROS, pela ação de doadores de hidrogênio na presença de oxigênio, ou pela autooxidação da hemoglobina.<sup>25</sup>

A fosfatase ácida (FA) ou proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular, do glóbulo vermelho, consiste numa proteína tirosina fosfatase presente em diversos tecidos humanos, que pode ser um mecanismo de regulação de diversos processos celulares como o crescimento celular, proliferação e transformação. Embora na doença psoriásica ocorra um crescimento celular, hiperproliferação do queratinócitos, nós encontramos uma menor atividade da FA na população psoriásica em relação aos restantes grupos. Esta baixa da FA poderá dever-se a inibição por parte do NO, alguns estudos revelam que o NO inibe diversas fosfatases e esta inibição aparenta ocorrer através da reação do NO com resíduo de cisteína presente no centro ativo das várias fosfatases, em particular da eritrocitária (ACP1).<sup>124</sup>

Sendo o NO um radical livre, este assume particular relevância na interação com radicais livres, atuando simultaneamente como neutralizador de ROS ou como promotor da geração de ROS, dependendo da homeostasia e/ou sobrecarga oxidante.<sup>55,56</sup> Esta relação entre o NO e as ROS, assim como a interação destes com as atividades enzimáticas do eritrócito poderão explicar em parte a correlação direta tem e FA e a RTMHb.

Quando se procedeu a análise do papel dos genes modificados e de alguns parâmetros bioquímicos, apenas será analisada a relação genótipo-fenótipo para a psoríase, uma vez que para a população controle e de hipertensos, os resultados sugerem uma independência dos polimorfismos estudados em relação a variação das atividades enzimáticas.

Quando se considerou a interação genótipo-fenótipo para a os indivíduos com psoríase a RTM apresentou uma tendência para uma diminuição desta em indivíduos com genótipo CC do polimorfismo C(677)T do gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).

A MTHFR é uma importante enzima do metabolismo da homocisteína. Os indivíduos homozigóticos para o genótipo TT têm a enzima MTHFR mais termolábil e com menor afinidade para FADH<sub>2</sub>, coenzima da homocisteína, logo menos atividade catalítica. A menor atividade da MTHFR, em indivíduos com a variante TT, leva a um aumento da metilenotetrahidrofolato, visto que a uma menor conversão em metiltetrahidrofolato. Este aumento da metilenotetrahidrofolato força o ciclo no sentido do folatos. Por sua vez, os folatos são essenciais para a proliferação celular e a regeneração de tecidos.

Neste contexto, a interação entre o genótipo e a RTM, com aumento desta para indivíduos portadores do alelo T, está associada a baixa atividade da MTHFR, e conseqüente ao crescimento celular, conduzindo a uma maior atividade da RTM do eritrócito.

Estudos em doentes com psoríase têm demonstrados uma associação entre esta e o que polimorfismo MTHFR C677T, nomeadamente para a variante termolábil.<sup>96,125</sup>

Por outro lado, Vasku et al em 2009, demonstraram que polimorfismo MTHFR C677T esta ligeiramente associado a psoríase.<sup>126</sup> De acordo com os seus resultados, o genótipo CC do polimorfismo traz 1,6 maior risco para a psoríase, porem a maior frequência do alelo C foi observado em pacientes com psoríase eritrodérmica e pustulosa. Porem quando separados de acordo com a historia familiar para a frequência de psoríase e diabetes mellitus, o alelo T esteve mais frequente nesses pacientes, com

psoríase. Por conseguinte, genótipo MTHFR pode ser uma parte de uma predisposição genética para a psoríase.

Para a atividade da FA do eritrócito está manifestou uma interação com o polimorfismo Val158Met do gene da COMT, tendo-se verificados um aumento da atividade da FA para os indivíduos com o genótipo GG.

A Catecol-O-Metiltransferase (COMT) apresenta um papel importante na inativação metabólica de catecolaminas, nomeadamente a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina, que se encontra em vários tecidos do organismo, nomeadamente nos queratinócitos e linfócitos.<sup>127</sup> As catecolaminas, envolvidas no processo inflamatório, são produzidas pela medula da supra-renal, pelos queratinócitos e por células imunitárias, células T, tendo como função a modulação da proliferação e diferenciação de linfócitos bem como a produção de citocinas.<sup>128</sup> Assim, esta enzima parece desempenhar um papel na patofisiologia desta doença, na medida em que atua sobre o sistema imunitário (inato e adaptativo) e sobre os queratinócitos através do controlo das catecolaminas.

Como referido anteriormente a FA, consiste numa proteína tirosina fosfatase presente em diversos tecidos humanos, de entre os quais nos queratinócitos. Silva et al em 2015, demonstrou a uma ação direta da atividade da FA na resposta dos queratinócitos a choque hipoosmótico.<sup>124</sup>

Neste contexto os níveis aumentados da atividade da FA, associados ao genótipo GG, por nos encontrados, podem ser explicados pela maior atividade da COMT. Ou seja, se o alelo G está associada à variante da enzima com alta atividade (COMT<sub>H</sub>) e maior estabilidade em altas temperaturas, então haverá uma maior metabolização das catecolaminas. Uma vez que a COMT atua sobre os queratinócitos pelo controlo das catecolaminas, neste caso, uma maior metabolização das catecolaminas poderá estar associada a uma maior atividade da FA, mediada pelos queratinócitos.

## **CONCLUSÃO**



## **6. CONCLUSÃO**

Com o presente trabalho verificou-se que a população psoriásica por nós estudada não se encontra bem controlada, uma vez que apresenta PASI moderado a grave, o que poderá dever-se ao facto de ter sido recrutada do serviço de dermatologia do hospital de Santa Maria. Uma vez que este é um serviço de referência, ao qual ocorre doentes com formas mais graves, e/ou em fase de exacerbação, deste modo os dados encontrados não são necessariamente indicadores de uma população mal controlada, mas sim de uma população com formas mais graves e/ou em exarcebação. Porém, a idade de diagnóstico observada antes dos 40 anos, precoce, influencia o desenvolvimento da patologia. Sabe-se que quanto mais cedo o diagnóstico mais grave é a sua evolução.

Uma vez que se trata de uma doença crónica autoimune inflamatória, os polimorfismos genéticos estudados tinham em vista o processo inflamatório partilhado por esta patologia e a doença cardiovascular. Porém os resultados obtidos não demonstraram relação com a gravidade na população psoriásica nem na população de hipertensos, provavelmente ao número reduzido de doentes. Muito embora sendo uma doença multifatorial, por si só estes polimorfismos não influenciam o desenvolvimento da patologia

No entanto quando relacionados com atividades enzimáticas e/ou parâmetros bioquímicos, observou-se que o stress oxidante e uma possível desregulação na via da homocisteína contribuem para o desenvolvimento e progressão da patologia, nomeadamente as atividades eritrocitárias que se encontram diminuídas na população psoriásica.

Não obstante, os parâmetros bioquímicos das análises correntes, muito embora estejam dentro dos limites considerados normais, é de salientar alterações destes com a gravidade da psoríase.

Muito embora, não tenho sido possível, em tempo útil, fazer uma análise para as possíveis comorbilidades cardiovasculares por esta população desenvolvida, os dados por nós encontrados sugerem uma relação com a doença cardiovascular. Visto que as alterações das atividades do eritrócito, RTM, RTMHb, FA, assim como a atividade sérica da ECA, sugerem um stress oxidante nos psoriásicos, o que também se verifica na doença cardiovascular, como descrito na literatura.

## **PERSPETIVAS FUTURAS**

São importantes mais estudos para perceber melhor o contributo de genes relacionados com o stress oxidante e via da homocisteína de forma a se poder perceber melhor o processo inflamatório partilhado pela psoríase e doença cardiovascular.

Assim a necessidade de aumentar as amostras, bem como uma informação mais detalhada, quanto a história familiar e/ou doenças cardiovasculares desenvolvidas são um dos principais interesses. No entanto o desenvolvimento e novos biomarcadores, nomeadamente relacionados com estas vias são fatores a ser levados em conta.



## **REFERÊNCIAS**





## 7. REFERENCIAS

1. Sales ARJ. Psoríase e risco de doença cardiovascular. Dissertação Mestrado Integrado em Medicina; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto 2014.
2. Rosa DJF, MacHado RF, Matias F a T, et al. Influence of severity of the cutaneous manifestations and age on the prevalence of several cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2012;26(3):348-353.
3. McDonald I, Connolly M, Tobin AM. A review of psoriasis, a known risk factor for cardiovascular disease and its impact on folate and homocysteine metabolism. *J Nutr Metab.* 2012;2012.
4. Gisondi P, Girolomoni G. Cardiometabolic Comorbidities and the Approach to Patients with Psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100(SUPPL. 2):14-21.
5. Chong HT, Kopecki Z, Cowin AJ. Lifting the silver flakes: The pathogenesis and management of chronic plaque psoriasis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:1-9.
6. Almeida IM da M. PSORÍASE E FACTORES DE RISCO CARDIOVASCULAR. Dissertação de Mestrado em Integrado em Medicina; Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto 2011.
7. Torres T, Sales R, Vasconcelos C, Selores M. Psoríase e Doença Cardiovascular. *Acta Med Port.* 2013;26(5):601-607.
8. Gelfand JM, Mehta NN, Langan SM. Psoriasis and Cardiovascular Risk: Strength in Numbers Part II. *J Invest Dermatol.* 2012;131(5):1007-1010.
9. Naldi L, Mercuri SR. Epidemiology of comorbidities in psoriasis. *Dermatol Ther.* 2010;23(2):114-118.
10. Flytström I. Different aspects of psoriasis etiology and treatment. 2012.
11. Salihbegovic E, Hadzigraphic N, Cickusic A. Psoriasis and Metabolic Syndrome. *Med Arch.* 2015;69(2):85.
12. Takahashi H, Iizuka H. Psoriasis and metabolic syndrome. *J Dermatol.* 2012;39(3):212-218.
13. National Psoriasis Foundation. Psoriasis is an autoimmune disease that causes raised, red, scaly patches to appear on the skin. ABOUT PSORIASIS. [www documento] URL <https://www.psoriasis.org/about-psoriasis>. [Acedido em Sembro 2016]
14. Marques Pinto G, Filipe P. Normas de boa pratica para o tratamento da psoríase em placas em idade Não Pediátrica com Biologicos. *Acta Med Port.* 2012;25(2):125-141.
15. PSOPortugal. PSOPortugal. Psoríases- Tipos. [www documento] URL [http://www.psoportugal.pt/live/page\\_reader.php?p=302&t=VG1wb3M=&g=UHNvcsOtYXNl](http://www.psoportugal.pt/live/page_reader.php?p=302&t=VG1wb3M=&g=UHNvcsOtYXNl). [Acedido em Agosto 2016].

## REFERÊNCIA

16. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(5):826-850.
17. Pérez LB, López RL, Ramos JG. Psoriasis ungueal. *An Pediatr*. 2013;13:1492-1993.
18. Chan C, Van Voorhees A, Lebwohl M, et al. Treatment of severe scalp psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(6):962-971.
19. Chaves YN, Cardoso DN, Jorge PFL, Follador I, Oliveira M de FP de. Childhood pustular psoriasis: case report. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):899-902.
20. Feldman SR, Krueger GG. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis*. 2005;64 Suppl 2(suppl 2):ii65-8..
21. Mehta NN, Yu Y, Pinnelas R, et al. Attributable Risk Estimate of Severe Psoriasis on Major Cardiovascular Events. *Am J Med*. 2011;124:775.e1-775.e6.
22. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*. 2007;445(7130):866-873.
23. Sousa M. *Estudo de Variantes Polimórficas Associadas Às Catecolaminas Na Psoríase.*; Mestrado Integrado em Medicina, Universidade do Algarve 2015.
24. Sanchez APG. Immunopathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol*. 2010;85(5):747-749.
25. Gupta R, Debbaneh MG, Liao W. Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep*. 2014;3(1):61-78.
26. Ghazizadeh R, Shimizu H, Tosa M, Ghazizadeh M. Pathogenic mechanisms shared between psoriasis and cardiovascular disease. *Int J Med Sci*. 2010;7(5):284-289.
27. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Mechanisms of Disease: Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009;361(5):496-509.
28. Feletar M, Foley P, Brown MA. Developments in psoriasis and psoriatic arthritis. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(1):47-54.
29. Valdimarsson H. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007;25(6):563-567.
30. Setty AR, Curhan G, Choi HK. Smoking and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Am J Med*. 2007;120(11):953-959.
31. de Oliveira M de FSP, Rocha B de O, Duarte GV. Psoriasis: Classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):09-20.
32. Radtke MA, Reich K, Blome C, Rustenbach S, Augustin M. Prevalence and clinical features of psoriatic arthritis and joint complaints in 2009 patients with psoriasis: Results of a German national survey. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009;23(6):683-691.
33. Reich K. The concept of psoriasis as a systemic inflammation: Implications for disease

- management. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2012;26(SUPPL. 2):3-11.
34. Dowlatshahi EA, Van Der Voort EAM, Arends LR, Nijsten T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: A systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2013;169(2):266-282.
  35. Horreau C, Pouplard C, Brenaut E, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: A systematic literature review. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2013;27(SUPPL.3):12-29.
  36. Samarasekera EJ, Neilson JM, Warren RB, Parnham J, Smith CH. Incidence of cardiovascular disease in individuals with psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2340-2346.
  37. Armstrong EJ, Harskamp CT, Armstrong AW. Psoriasis and major adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(e000062):1-10.
  38. Torres T, Sales R, Vasconcelos C, Martins da Silva B, Selores M. Framingham Risk Score underestimates cardiovascular disease risk in severe psoriatic patients: implications in cardiovascular risk factors management and primary prevention of cardiovascular disease. *J Dermatol.* 2013;40(11):923-926.
  39. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. The association between psoriasis and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Hypertens.* 2013;31(3):433-42-3.
  40. Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2006;55(5):829-835.
  41. Coto-Segura P, Eiris-Salvado N, González-Lara L, et al. Psoriasis, psoriatic arthritis and type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2013;169(4):783-793.
  42. Boehncke S, Thaci D, Beschmann H, et al. Psoriasis patients show signs of insulin resistance. *Br J Dermatol.* 2007;157(6):1249-1251.
  43. Salihbegovic E, Hadzigraphic N, Suljagic E, et al. Psoriasis and Dyslipidemia. *Mater Socio Medica.* 2015;27(1):15.
  44. Daudéna E, Castañedab S, Suárezc C, et al. Abordaje integral de la comorbilidad del paciente con psoriasis Integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(Supl 1):1-64.
  45. World Health Organization. WHO Europe obesity data and statistics. Obesity.[www documento] URL <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>. [accedido Agosto 2016].
  46. Gerdes S, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U. Adipokines and psoriasis. *Exp Dermatol.* 2011;20(2):81-87.
  47. Jensen P, Zachariae C, Christensen R, et al. Effect of Weight Loss on the Severity of Psoriasis.

## REFERÊNCIA

- JAMA Dermatology*. 2013;149(7):795.
48. Gisondi P, Tessari G, Conti a, et al. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital-based case-control study. *Br J Dermatol*. 2007;157(1):68-73.
  49. Cohen A, Gilutz H, Henkin Y, et al. Psoriasis and the Metabolic Syndrome. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(6):506-509.
  50. Langan S, Seminara N. Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a population-based study in the United Kingdom. *J Investig*. 2012;132(3):556-562.
  51. Fortes C, Mastroeni S, Leffondré K, et al. Relationship Between Smoking and the Clinical Severity of Psoriasis. *Arch Dermatol*. 2005;141(12):175-190.
  52. Abuabara K, Azfar RS, Shin DB, Neimann AL, Troxel AB, Gelfand JM. Cause-specific mortality in patients with severe psoriasis: a population-based cohort study in the U.K. *Br J Dermatol*. 2010;163(3):586-592.
  53. Pietrzak A, Bartosińska J, Chodorowska G, Szepietowski JC, Paluszkiewicz P, Schwartz R a. Cardiovascular aspects of psoriasis: An updated review. *Int J Dermatol*. 2013;52(2):153-162.
  54. González-Gay MA, González-vela C, González-Juanatey C. Psoriasis: a Skin Disease Associated With Increased Cardiovascular Risk. *Actas Dermosifiliogr*. 2012;103(7):595-598.
  55. Liu D, Fernandez BO, Hamilton A, et al. UVA Irradiation of Human Skin Vasodilates Arterial Vasculature and Lowers Blood Pressure Independently of Nitric Oxide Synthase. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1839-1846.
  56. Halliday GM, Byrne SN. An Unexpected Role: UVA-Induced Release of Nitric Oxide from Skin May Have Unexpected Health Benefits. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1791-1794.
  57. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003;54(4):469-487.
  58. Durackova Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res*. 2010;59(4):459-469.
  59. Cals-Grierson MM, Ormerod AD. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2004;10(4):179-193.
  60. Zago AS, Zanesco A. Clinical Update Nitric Oxide , Cardiovascular Disease and Physical Exercise. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:260-266.
  61. Kadam DP, Suryakar AN, Ankush RD, Kadam CY, Deshpande KH. Role of oxidative stress in various stages of psoriasis. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(4):388-392.
  62. Singh VK, Mehrotra S, Narayan P, Pandey CM, Agarwal SS. Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide. *Immunol Res*. 2000;22(1):1-19.
  63. Kennett EC, Kuchel PW. Review Article Redox Reactions and Electron Transfer Across the Red Cell Membrane. *IUBMB Life*. 2003;55(July):375-385.

64. McCully KS. The biomedical significance of homocysteine. *Jse*. 2001;15(1):5-20.
65. Varga EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Cardiology patient pages. Homocysteine and MTHFR mutations: relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(19):e289-93.
66. Marinho C, Alho I, Arduíno D, Falcão LM, Brás-Nogueira J, Bicho M. GST M1/T1 and MTHFR polymorphisms as risk factors for hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353(2):344-350.
67. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet*. 2008;49(3):267-282.
68. Bilgiç Ö, Altinyazar HC, Baran H, Ünlü A. Serum homocysteine, asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and other arginine–NO pathway metabolite levels in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2015.
69. Van Guldener C, Nanayakkara PWB, Stehouwer CDA. Homocysteine and asymmetric dimethylarginine (ADMA): Biochemically linked but differently related to vascular disease in chronic kidney disease. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(12):1683-1687.
70. Au-Yeung KKW, Yip JCW, Siow YL, O K. Folic acid inhibits homocysteine-induced superoxide anion production and nuclear factor kappa B activation in macrophages. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(1):141-147.
71. Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(2):56-61.
72. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(14):6369-6373.
73. Chao CL, Kuo TL, Lee YT. Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium- dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation*. 2000;101(5):485-490.
74. Jamaluddin MS, Chen I, Yang F, et al. Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. *Blood*. 2007;110(10):3648-3655.
75. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest*. 2001;107(10):1263-1273.
76. Malerba M, Gisoni P, Radaeli A, Sala R, Calzavara Pinton PG, Girolomoni G. Plasma homocysteine and folate levels in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2006;155(6):1165-1169.
77. Tobin a-M, Hughes R, Hand EB, Leong T, Graham IM, Kirby B. Homocysteine status and cardiovascular risk factors in patients with psoriasis: a case-control study. *Clin Exp Dermatol*. 2011;36(1):19-23.

## REFERÊNCIA

78. Lundberg JO, Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(1):39-45.
79. Marsden P a, Heng HH, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268(15):17478-17488.
80. Wattanapitayakul SK, Mihm MJ, Young a P, Bauer J a. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(7):361-368.
81. Patkar S, Charita BH, Ramesh C, Padma T. High risk of essential hypertension in males with intron 4 VNTR polymorphism of eNOS gene. *Indian J Hum Genet.* 2011;15(2):49-53.
82. Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and diabetic nephropathy among Asian Indians. *Mol Cell Biochem.* 2008;314(1-2):9-17.
83. Coto-Segura P, Coto E, Mas-Vidal A, et al. Influence of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in psoriasis risk. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(6):445-449.
84. Haznedaroglu IC, Öztürk MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):867-880.
85. Fleming I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res.* 2006;98(7):887-896.
86. Abd Alla J, El Faramawy Y, Quitterer U. Microarray gene expression profiling reveals antioxidant-like effects of angiotensin II inhibition in atherosclerosis. *Front Physiol.* 2013;4(June):148.
87. Ozkur M, Erbagci Z, Nacak M, Tuncel a a, Alasehirli B, Aynacioglu a S. Association of insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with psoriasis. *Br J Dermatol.* 2004;151(4):792-795.
88. COELHO C, GUERRA A, REGO C, et al. Polimorfismos Genéticos da Enzima Conversora da Angiotensina-I (ECA), Haptoglobina (HP) e Angiotensinogénio (AGT) e Parâmetros de Sobrecarga Oxidante, em Adolescentes de 12-15 Anos de Idade. *Rev Port Cardiol.* 2006;25(7-8):677-690.
89. Liu T, Han Y, Lu L. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and the risk of psoriasis: a meta-analysis. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38(4):352-359.
90. Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJM, den Heijer M. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(1):103-109.
91. Johnson WG, Stenroos ES, Spsychala JR, Chatkupt S, Ming SX, Buyske S. New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet.* 2004;124A(4):339-345.
92. Stanisławska-Sachadyn A, Brown KS, Mitchell LE, et al. An insertion/deletion polymorphism of the dihydrofolate reductase (DHFR) gene is associated with serum and red blood cell folate

- concentrations in women. *Hum Genet.* 2008;123(3):289-295.
93. Askari BS, Krajcinovic M. Dihydrofolate reductase gene variations in susceptibility to disease and treatment outcomes. *Curr Genomics.* 2010;11:578-583.
  94. Summers CM, Hammons AL, Mitchell LE, et al. Influence of the cystathionine beta-synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(8):1010-1013.
  95. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(4):195-201.
  96. Liew S-C, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):1-10.
  97. Biselli PM, Guerzoni AR, De Godoy MF, et al. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and concentrations of methylmalonic acid and folate on plasma homocysteine and risk of coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;29(1):32-40.
  98. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(12):1717-1725.
  99. Le Marchand L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR. Association of the myeloperoxidase -463G-->a polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(2):181-184.
  100. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther.* 2006;111(1):16-26.
  101. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46116-46122.
  102. Chu H, Wang M, Wang M, et al. The MPO-463G>A polymorphism and cancer risk: A meta-analysis based on 43 case-control studies. *Mutagenesis.* 2010;25(4):389-395.
  103. Tang N, Wang Y, Mei Q. Myeloperoxidase G-463A polymorphism and susceptibility to coronary artery disease: A meta-analysis. *Gene.* 2013;523(2):152-157.
  104. Weng K-P, Ho T-Y, Chiao Y-H, et al. Cytokine genetic polymorphisms and susceptibility to Kawasaki disease in Taiwanese children. *Circ J.* 2010;74(12):2726-2733.
  105. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:10-13.
  106. Marques F, Crespo ME, Silva ZI, Bicho M. Redox modulation of reductase and phosphatase activities in human erythrocytes. *Protoplasma.* 1999;206(1-3):168-173.
  107. Marques F, Bicho M. Activation of a NADH dehydrogenase in the human erythrocyte by beta -adrenergic agonists : possible involvement of a G protein in enzyme activation. *Biol Signals.*

## REFERÊNCIA

- 1997;6(2):52-61.
108. May J, Qu Z, Whitesell R. Ascorbate is the major electron donor for a transmembrane oxidoreductase of human erythrocytes . *Biochim Biophys Acta*. 1995;1238(2):127-136.
109. Grebing C, Crane F, Löw H, Hall K. A transmembranous NADH - dehydrogenase in human erythrocyte membranes. *J Bioenerg Biomembr*. 1984;5(6):517-533.
110. Qian C, Schoemaker RG, van Gilst WH, Roks AJM. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular progenitor cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(4):301-314.
111. Guimarães PB, Alvarenga ÉC, Siqueira PD, et al. Angiotensin II binding to angiotensin I-converting enzyme triggers calcium signaling. *Hypertension*. 2011;57(5):965-972.
112. Faure-delanef L, Baudin B, Beaudoin J, et al. Plasma concentration , kinetic constants , and gene polymorphism of angiotensin I-converting enzyme in centenarians. *Clin Chem*. 1998;44(10):2083-2087.
113. Board PG, Pidcock ME. Methaemoglobinaemia resulting from heterozygosity for two NADH-methaemoglobin reductase variants: characterization as NADH-ferricyanide reductase. *Br J Haematol*. 1981;47(3):361-370.
114. Marques F, Crespo ME, Silva ZI, Bicho M. Insulin and high glucose modulation of phosphatase and reductase enzymes in the human erythrocytes: A comparative analysis in normal and diabetic states. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47(3):191-198.
115. Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
116. Shelling ML, Federman DG, Prodanovich S, Kirsner RS. Psoriasis and Vascular Disease: An Unsolved Mystery. *Am J Med*. 2008;121(5):360-365.
117. Fernández-Torres R, Pita-Fernández S, Fonseca E. Psoriasis and cardiovascular risk . Assessment by different cardiovascular risk scores. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013;27(12):1566-1570.
118. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredi A, Quintanilhas A, Teixeira F. Erythrocyte damage in mild and severe psoriasis. *Br J Dermatol*. 2004;150:232-244.
119. Murador P, Deffune E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(2):168-178..
120. Vanizor Kural B, Örem A, Çimşit GU, Yandi YE, Calapoğlu M. Evaluation of the atherogenic tendency of lipids and lipoprotein content and their relationships with oxidant-antioxidant system in patients with psoriasis. *Clin Chim Acta*. 2003;328(1-2):71-82.
121. Hofmeister LH, Perisic S, Titze J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2015;467(3):551-558.



122. Binger KJ, Linker RA, Muller DN, Kleinewietfeld M. Sodium chloride, SGK1, and Th17 activation. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2015;467(3):543-550.
123. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell*. 2008;133(2):223-234.
124. Silva RA, Palladino M V., Cavaleiro RP, et al. Activation of the low molecular weight protein tyrosine phosphatase in keratinocytes exposed to hyperosmotic stress. *PLoS One*. 2015;10(3):1-19.
125. Liew SC, Das-Gupta E, Wong SF, Lee N, Safdar N, Jamil A. Association of Methylentetrahydrofolate Reductase (MTHFR) 677 C > T gene polymorphism and homocysteine levels in psoriasis vulgaris patients from Malaysia: a case-control study. *Nutr J*. 2012;11(1):1.
126. Vasku V, Bienertova-Vasku J, Necas M, Vasku A. MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) C677T polymorphism and psoriasis. *Clin Exp Med*. 2009;9(4):327-331.
127. Malhotra AK, Kestler LJ, Mazzanti C, Bates JA, Goldberg T, Goldman D. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am J Psychiatry*. 2002;159(4):652-654.
128. Flierl M, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines—Crafty Weapons in the Inflammatory Arsenal of Immune/Inflammatory Cells or Opening Pandora’s Box? *Mol Med*. 2008;14(3-4):1.



**ANEXOS**



## ANEXOS

### ANEXO 1: Calculo PASI (Índice de Extensão e Gravidade da Psoríase)

#### PASI (Psoriasis Area and Severity Index)

É uma das formas de avaliar a gravidade e extensão da psoríase. Trata-se de uma estimativa não objectiva, pois depende do avaliador.

Para calcular o PASI, devem seguir-se os seguintes passos, que estão resumidos na tabela abaixo.

- Divide-se a área corporal em 4 partes: cabeça, membros superiores, tronco e membros inferiores.
- Em cada uma das áreas corporais avalia-se a extensão do eritema, espessura das lesões e grau de descamação, numa escala de 0 a 4, sendo que 0 é a ausência de sinais e de 1 a 4 há aumento da gravidade dos sinais.
- Somam-se os resultados obtidos na alínea anterior, separadamente para cada área corporal.
- Determina-se o score de área corporal envolvida, numa escala de 0 a 6, em função da percentagem de área corporal afectada, na seguinte correspondência: 0 = 0%; 1 = <10%; 2 = 10–<30%; 3 = 30–<50%; 4 = 50–<70%; 5 = 70–<90%; e 6 = 90–100%.
- Multiplica-se, separadamente para cada área corporal, os valores obtidos nas alíneas c) e d).
- Multiplica-se o valor obtido na alínea e) pelo score por área corporal (na linha 6 da tabela), para cada área corporal.
- A soma dos 4 resultados obtidos na alínea anterior, dá o valor do PASI.

|   |  | Cabeça | Membros Superiores | Tronco | Membros Inferiores |
|---|--|--------|--------------------|--------|--------------------|
| 1 | Eritema  |        |                    |        |                    |
| 2 | Espessura  |        |                    |        |                    |
| 3 | Descamação   |        |                    |        |                    |
| 4 | Soma das linhas 1, 2 e 3   |        |                    |        |                    |
| 5 | Score de área corporal envolvida                                   |        |                    |        |                    |
| 6 | Multiplicação das linhas 4, 5 e 6 (score por área corporal)        | 0,1    | 0,2                | 0,3    | 0,4                |
| 7 | Somar o resultado da linha 6 de todas as colunas para obter o PASI |        |                    |        |                    |

ANEXO 2: Consentimento informado

**Declaração de consentimento**

Eu, abaixo assinado, \_\_\_\_\_ compreendi a explicação que me foi fornecida por \_\_\_\_\_ (investigador) em relação à investigação em que serei incluído(a). Foi-me dada a oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias e das quais obtive resposta satisfatória.

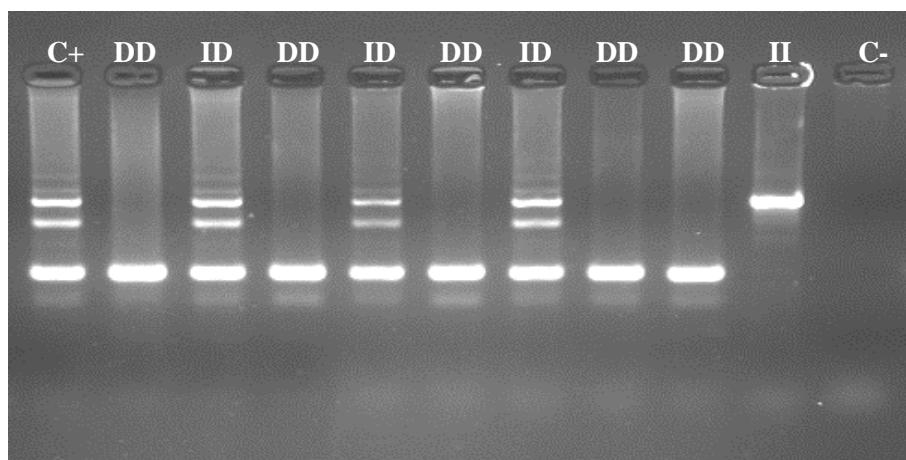
Tomei conhecimento de que, de acordo com a Declaração de Helsínquia, a informação prestada me elucidou sobre os objetivos, os métodos, os benefícios e potenciais riscos, bem como, o eventual desconforto pela participação neste estudo. Além disso, fui informado que tenho o direito de recusar/desistir da minha participação sem que isso implique qualquer prejuízo nos cuidados de saúde que me são prestados. Os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos e ser alvo de publicação, mas os dados de identidade pessoal serão sempre tratados com confidencialidade.

Deste modo, consinto que me seja aplicado o método, tratamento ou inquérito proposto pelo investigador que me apresentou o estudo.

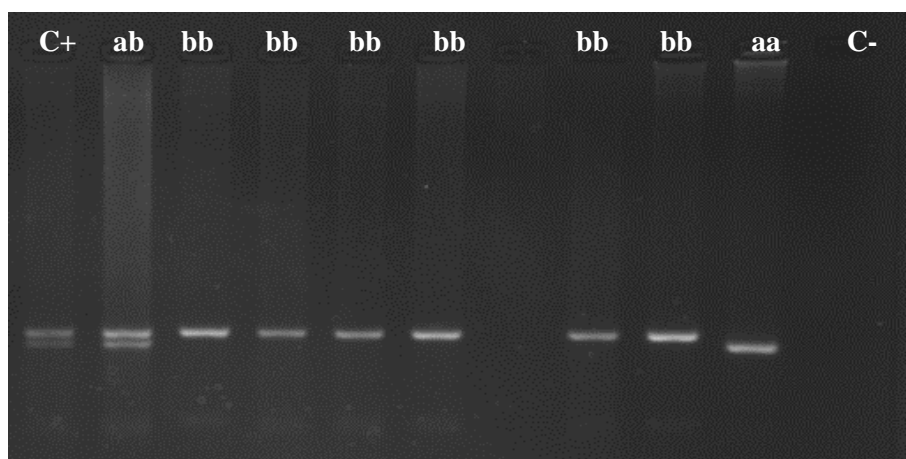
\_\_\_\_\_, Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_, Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

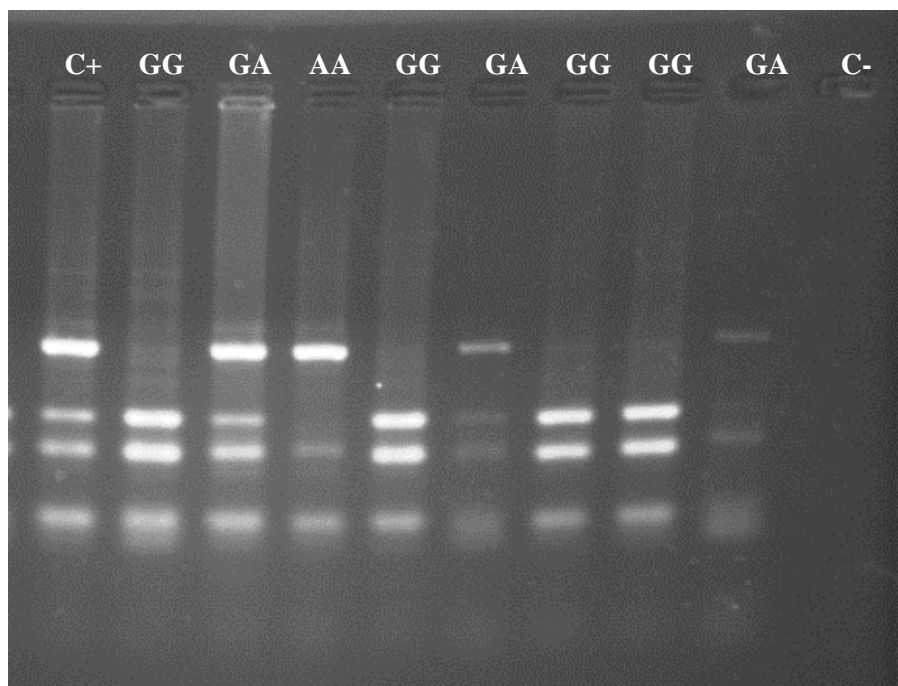
## ANEXO 3: Visualização do genótipo após eletroforese



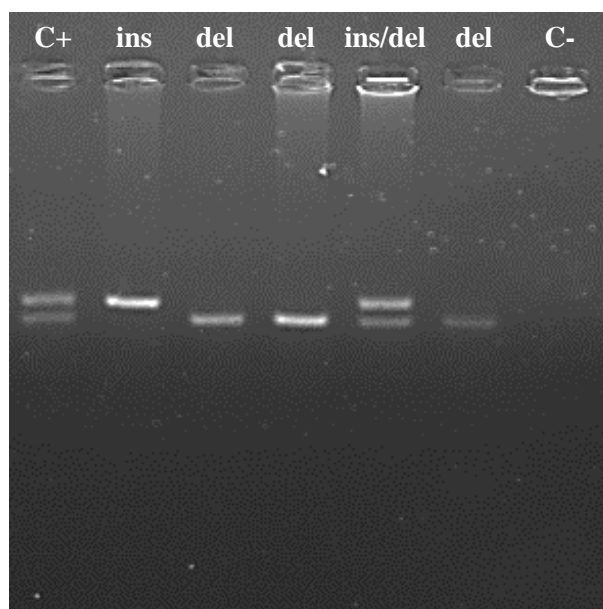
**Figura Suplementar 1:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR de genótipo ECA. O fragmento DD de 190 pb revela o fenótipo homozigótico deleção; o II de 477 pb corresponde ao fenótipo homozigótico para a inserção da sequência *Alu*; e o ID ao fenótipo heterozigótico inserção/deleção. C+ é o controle positivo e C- o controle negativo.



**Figura Suplementar 3:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR de genótipo NOS3. O fragmento aa de 393 pb revela o fenótipo homozigótico com 4 repetições (2 A e 2 G); o bb de 420 pb corresponde ao fenótipo homozigótico com 5 repetições (3 A e 2 G); e o ab ao fenótipo heterozigótico (420+393 pb). C+ é o controle positivo e C- o controle negativo.

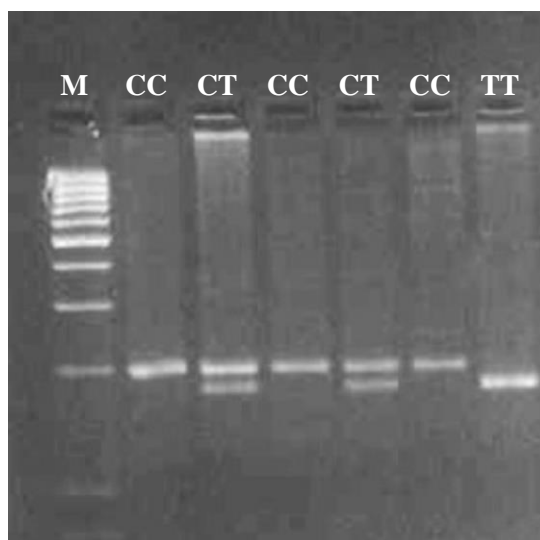


**Figura Suplementar3:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR-RFLP de genótipo MPO. O fragmento GG de 393+120+61 pb revela o fenótipo homozigótico sem mutação; o AA de 289+61 pb corresponde ao fenótipo homozigótico com mutação; e o GA ao fenótipo heterozigótico (289+269+120+61 pb). C+ é o controlo positivo e C- o controlo negativo.

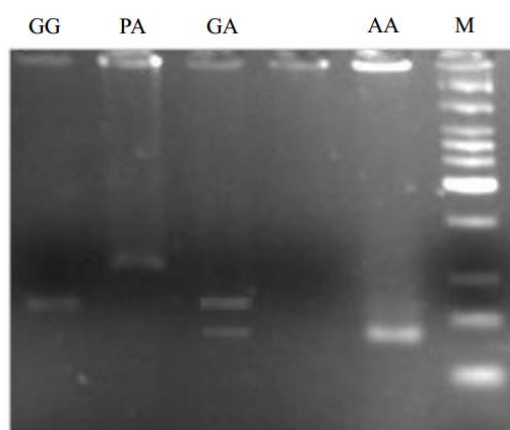


**Figura Suplementar 4:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR de genótipo DHFR. O fragmento ins de 144 pb revela o fenótipo homozigótico inserção de 19pb; o del de 125 pb corresponde ao fenótipo homozigótico para à deleção de 19 pb; e o ins/del ao fenótipo heterozigótico inserção/deleção (144+125 pb). C+ é o controlo positivo e C- o controlo negativo.





**Figura Suplementar5:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR-RFLP de genótipo *MTHFR*. O fragmento CC, fenótipo homozigótico, de 198 pb revela o produto de PCR não digerida do alelo C. O TT, fenótipo homozigótico, de 175 pb corresponde à digestão alelo T com *Hinfl*; e o CT representa o fenótipo heterozigótico (198+175 pb) M Marcador de peso molecular (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas).



**Figura Suplementar 6:** Gel de amplificação do polimorfismo do PCR-RFLP de genótipo *COMT*; O fragmento GG, fenótipo homozigótico, de 89 pb revela o produto de PCR não digerida do alelo G. O AA, fenótipo homozigótico, de 71 pb corresponde à digestão alelo A; e o GA representa o fenótipo heterozigótico (89+71 pb); PA representa o produto *COMT* amplificado (111bp); M Marcador de peso molecular (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas).